

BUNDESPUBLIK DEUTSCHLAND

CT/EP 53772
03/07686

Rec'd PCT/PTO 24 JAN 2005

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 22 AUG 2003
WIPO PCT

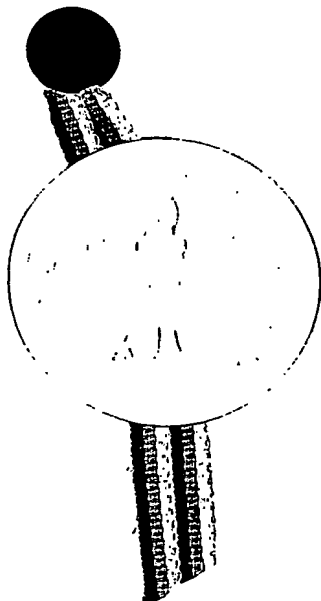
**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 33 522.2
Anmeldetag: 23. Juli 2002
Anmelder/Inhaber: BASF Aktiengesellschaft,
Ludwigshafen/DE
Bezeichnung: Saccharose-6-Phosphatase als Target für Herbizide
IPC: A 01 N 37/44

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 03. Juli 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Jerofsky



Patentansprüche

1. Verwendung eines Polypeptides mit der biologischen Aktivität
5 einer Saccharose-6-Phosphat Phosphatase kodiert durch eine
Nukleinsäuresequenz umfassend:
- a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1; SEQ ID
10 NO:3 oder SEQ ID NO:5 dargestellten Nukleinsäuresequenz;
oder
- b) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degene-
rierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der
15 in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:6 dargestell-
ten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder
- c) funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID
20 NO:1 mit einer Identität von mindestens 55% zu der SEQ ID
NO:1; oder funktionelle Äquivalente der Nukleinsäurese-
quenz SEQ ID NO:3 mit einer Identität von mindestens 55%
zu der SEQ ID NO:3; oder funktionelle Äquivalente der Nu-
kleinsäuresequenz SEQ ID NO:5 mit einer Identität von
mindestens 51% zu der SEQ ID NO:5; oder
- 25 d) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degene-
rierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Ami-
nosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID
NO:2, das eine Identität mit der SEQ ID NO:2 von minde-
stens 55% aufweist, ableiten läßt; oder eine Nukleinsäu-
30 resequenz, die sich aufgrund des degenerierten geneti-
schen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz
eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:4, das eine
Identität mit der SEQ ID NO:4 von mindestens 54% auf-
weist, ableiten läßt; oder eine Nukleinsäuresequenz, die
35 sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch
Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen
Äquivalents der SEQ ID NO:6, das eine Identität mit der
SEQ ID NO:6 von mindestens 54% aufweist, ableiten läßt;
- 40 als Targets für Herbizide.

2. Pflanzliche Nukleinsäuresequenzen kodierend für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer Saccharose-6-Phosphat Phosphatase umfassend:

- 5 a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 oder SEQ ID NO:5 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
- 10 b) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:6 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder
- 20 c) funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 mit einer Identität von mindestens 69% zu der SEQ ID NO:1; oder funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3 mit einer Identität von mindestens 69% zu der SEQ ID NO:3; oder funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:5 mit einer Identität von mindestens 63% zu der SEQ ID NO:5; oder
- 25 d) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:2, das eine Identität mit der SEQ ID NO:2 von mindestens 73% aufweist, ableiten läßt; oder eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:4, das eine Identität mit der SEQ ID NO:4 von mindestens 73% aufweist, ableiten läßt; oder eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:6, das eine Identität mit der
- 35 SEQ ID NO:6 von mindestens 72% aufweist, ableiten läßt.

3. Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer Saccharose-6-Phosphat Phosphatase als Target für Herbizide kodiert von einem Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 2.

40

4. Verfahren zur Detektion funktioneller Analoga der SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 oder SEQ ID NO:5

- 45 a) durch Herstellung einer Sonde gefolgt von anschließenden Durchsuchen einer genomischen oder cDNA Bank der entsprechenden Spezies; oder

3

- b) einer Computer-Recherche nach analogen Sequenzen in elektronischen Datenbanken.

5. Expressionskassette umfassend

5

- a) genetische Kontrollsequenzen in funktioneller Verknüpfung mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 2; oder

- b) zusätzliche Funktionselemente; oder

10

- c) eine Kombination aus a) und b).

6. Vektor umfassend eine Expressionskassette nach Anspruch 5.

- 15 7. Nicht humaner transgener Organismus umfassend mindestens eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer Saccharose-6-Phosphat Phosphatase gemäß Anspruch 2, eine Expressionskassette gemäß Anspruch 5 oder einen Vektor gemäß Anspruch 6 ausgewählt aus Bakterien, 20 Hefen, Pilzen, tierischen oder pflanzlichen Zellen.

8. Verwendung eines Polypeptides mit der biologischen Aktivität einer Saccharose-6-Phosphat Phosphatase kodiert durch eine Nukleinsäuresequenz umfassend:

25

- a) eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 2;

- b) funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 mit einer Identität von mindestens 55% zu der SEQ ID NO:1; oder funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3 mit einer Identität von mindestens 55% zu der SEQ ID NO:3; oder funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:5 mit einer Identität von mindestens 51% zu der SEQ ID NO:5; oder

30

- c) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:2, das eine Identität mit der SEQ ID NO:2 von mindestens 55% aufweist, ableiten läßt; oder eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:4, das eine Identität mit der SEQ ID NO:4 von mindestens 54% aufweist, ableiten läßt; oder eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen

35

40

45

4

Äquivalents der SEQ ID NO:6, das eine Identität mit der SEQ ID NO:6 von mindestens 54% aufweist, ableiten läßt;

in einem Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider Wirkung.

9. Verfahren zur Identifizierung von Substanzen mit herbizider Wirkung umfassend die folgenden Schritte:

10 i. Inkontaktbringen eines Polypeptides mit der biologischen Aktivität einer Saccharose-6-Phosphat Phosphatase kodiert durch eine Nukleinsäuresequenz umfassend:

a) eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 2;

20 b) funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 mit einer Identität von mindestens 55% zu der SEQ ID NO:1; oder funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3 mit einer Identität von mindestens 55% zu der SEQ ID NO:3; oder funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:5 mit einer Identität von mindestens 51% zu der SEQ ID NO:5; oder

25 c) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:2, das eine Identität mit der SEQ ID NO:2 von mindestens 55% aufweist, ableiten läßt; oder eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:4, das eine Identität mit der SEQ ID NO:4 von mindestens 54% aufweist, ableiten läßt; oder eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:6, das eine Identität mit der SEQ ID NO:6 von mindestens 54% aufweist, ableiten läßt;

40

mit einer oder mehreren Testverbindungen unter Bedingungen, die die Bindung der Testverbindung(en) an das Nukleinsäuremolekül oder an die Saccharose-6-Phosphat Phosphatase erlauben; und

45

5

- ii. Nachweis, ob die Testverbindung an die Saccharose-6-Phosphat Phosphatase aus i) bindet; oder
- 5 iii. Nachweis, ob die Testverbindung die Aktivität der Saccharose-6-Phosphat Phosphatase aus i) reduziert oder blockiert; oder
- 10 iv. Nachweis, ob die Testverbindung die Transkription, Translation oder Expression der Saccharose-6-Phosphat Phosphatase aus i) reduziert oder blockiert.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass
- 5 i. Saccharose-6-Phosphat Phosphatase kodiert durch eine Nukleinsäuresequenz umfassend
- a) eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 2;
- 20 b) funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 mit einer Identität von mindestens 55% zu der SEQ ID NO:1; oder funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3 mit einer Identität von mindestens 55% zu der SEQ ID NO:3; oder funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:5 mit
- 25 einer Identität von mindestens 51% zu der SEQ ID NO:5; oder
- 30 c) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:2, das eine Identität mit der SEQ ID NO:2 von mindestens 55% aufweist, ableiten läßt; oder eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der
- 35 Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:4, das eine Identität mit der SEQ ID NO:4 von mindestens 54% aufweist, ableiten läßt; oder eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der
- 40 Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:6, das eine Identität mit der SEQ ID NO:6 von mindestens 54% aufweist, ableiten läßt;

entweder in einem transgenen Organismus exprimiert wird
45 oder ein Organismus, der naturgemäß Saccharose-6-Phosphat Phosphatase enthält, kultiviert wird;

6

ii. die Saccharose-6-Phosphat Phosphatase aus Schritt i) im Zellaufschluss des transgenen bzw. nicht transgenen Organismus, in partiell gereinigter Form oder in zur Homogenität gereinigten Form mit einer Testverbindung in Kontakt gebracht wird; und

iii. eine Testverbindung selektiert wird, welche die Aktivität der Saccharose-6-Phosphat Phosphatase aus Schritt a) reduziert oder blockiert, wobei die Aktivität der mit der Testverbindung inkubierten Saccharose-6-Phosphat Phosphatase mit der Aktivität einer nicht mit einer Testverbindung inkubierten Saccharose-6-Phosphat Phosphatase verglichen wird.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass zur Bestimmung der Aktivität in Schritt iii) Saccharose-6-Phosphat als Substrat eingesetzt wird und das bei der Reaktion entstehende Orthophosphat durch Ammoniummolybdat quantifiziert wird.

12. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass es die folgende Schritte umfasst:

i. Herstellung eines transgenen Organismus nach Anspruch 7 oder eines transgenen Organismus enthaltend eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer Saccharose-6-Phosphat Phosphatase umfassend

b) funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 mit einer Identität von mindestens 55% zu der SEQ ID NO:1; oder funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3 mit einer Identität von mindestens 55% zu der SEQ ID NO:3; oder funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:5 mit einer Identität von mindestens 51% zu der SEQ ID NO:5; oder

c) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:2, das eine Identität mit der SEQ ID NO:2 von mindestens 55% aufweist, ableiten lässt; oder eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:4, das eine Identität mit der SEQ ID NO:4

von mindestens 54% aufweist, ableiten läßt; oder eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:6, das eine Identität mit der SEQ ID NO:6 von mindestens 54% aufweist, ableiten läßt; und

ii. Aufbringen einer Testsubstanz auf den transgenen Organismus nach i) und auf einen nicht-transgenen Organismus des gleichen Genotyps; und

iii. Bestimmen des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit des transgenen und des nicht transgenen Organismus nach der Aufbringung der Testsubstanz; und

iv. Selektion von Testsubstanzen, die ein vermindertes Wachstum oder eine eingeschränkte Überlebensfähigkeit des nicht-transgenen Organismus bewirken verglichen mit dem Wachstum des transgenen Organismus.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass es in einem pflanzlichen Organismus, einem Cyanobakterium oder einem Proteobakterium durchgeführt wird.

14. Verfahren zur Identifizierung von Substanzen mit wachstumsregulatorischer Wirkung, dadurch gekennzeichnet, dass es die folgende Schritte umfasst:

i. Herstellung einer transgenen Pflanze enthaltend eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer Saccharose-6-Phosphat Phosphatase umfassend

a) eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 2; oder

b) funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 mit einer Identität von mindestens 55% zu der SEQ ID NO:1; oder funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3 mit einer Identität von mindestens 55% zu der SEQ ID NO:3; oder funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:5 mit einer Identität von mindestens 51% zu der SEQ ID NO:5; oder

c) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der

SEQ ID NO:2, das eine Identität mit der SEQ ID NO:2 von mindestens 55% aufweist, ableiten läßt; oder eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:4, das eine Identität mit der SEQ ID NO:4 von mindestens 54% aufweist, ableiten läßt; oder eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:6, das eine Identität mit der SEQ ID NO:6 von mindestens 54% aufweist, ableiten läßt;

ii. Aufbringen einer Testsubstanz auf die transgene Pflanze nach i) und auf eine nicht-transgene Pflanze der gleichen Sorte;

iii. Bestimmen des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit der transgenen und der nicht transgenen Pflanze nach dem Aufbringen der Testsubstanz; und

iv. Selektion von Testsubstanzen, die ein verändertes Wachstum der nicht-transgenen Pflanze bewirken verglichen mit dem Wachstum der transgenen Pflanze.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Identifizierung der Substanzen in einem High-Throughput-Screening durchgeführt wird.

16. Träger, der eines oder mehrere der Nukleinsäuremoleküle nach Anspruch 2, oder eine oder mehrere Expressionskassetten nach Anspruch 5, einen oder mehrere Vektoren nach Anspruch 6, einen oder mehrere Organismen nach Anspruch 7 oder eines oder mehrere (Poly)peptide nach Anspruch 3 aufweist.

17. Verbindungen mit herbizider Wirkung identifiziert über eines der Verfahren nach den Ansprüchen 9 bis 13 und 15.

18. Verbindungen mit wachstumsregulatorischer Wirkung identifiziert über das Verfahren nach Anspruch 14 oder 15.

19. Verfahren zur Herstellung einer agrochemischen Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet dass man

9

- a) eine Verbindung mit herbizider Wirkung über eines der Verfahren nach den Ansprüchen 9 bis 13 und 15 oder eine Verbindung mit wachstumsregulatorischer Wirkung nach Anspruch 14 oder 15 identifiziert; und

5

- b) diese Verbindung zusammen mit geeigneten Hilfsmitteln zu Pflanzenschutzmitteln mit herbizider oder wachstumsregulatorischer Wirkung formuliert.

10 20. Verfahren zur Bekämpfung von unerwünschtem Pflanzenwuchs und/oder zur Regulation des Wachstums von Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine Verbindung nach Anspruch 17 oder 18 oder eine Zusammensetzung erhältlich über das in Anspruch 19 genannte Verfahren auf Pflanzen, deren Lebensraum und/oder auf Samen einwirken läßt.

15

21. Verwendung einer Verbindung nach Anspruch 17 oder 18 oder einer agrochemischen Formulierung erhältlich über das in Anspruch 19 genannte Verfahren in einem Verfahren nach Anspruch 20.

20

25

30

35

40

45

Saccharose-6-Phosphat Phosphatase als Target für Herbizide

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung eines Polypep-
5 tides mit der biologischen Aktivität einer Saccharose-6-Phosphat
Phosphatase, welches bei Nichtanwesenheit Wachstumsretardierungen
sowie chlorotische Blätter bedingt und durch die Nukleinsäurese-
quenzen SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 oder ein funktio-
nelles Äquivalent SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 oder SEQ ID NO:5 ko-
10 diert wird, als Target für Herbizide. Des weiteren betrifft die
vorliegende Erfindung die Verwendung des vorstehend genannten Po-
lypeptides in einem Verfahren zur Identifizierung von Verbindun-
gen mit herbizider oder wachstumsregulatorischer Wirkung, welche
Saccharose-6-Phosphat Phosphatase inhibieren. Des weiteren be-
trifft die Erfindung die Verwendung dieser über das Verfahren
identifizierten Verbindungen als Herbizide oder Wachstumsregula-
toren.

Das grundlegende Prinzip, Herbizide über Inhibierung eines defi-
20 nierten Targets zu identifizieren ist bekannt (z.Bsp. US
5,187,071, WO 98/33925, WO 00/77185). Generell besteht ein großer
Bedarf, Enzyme zu detektieren, welche neue Targets für Herbizide
darstellen könnten. Gründe hierfür sind auftretende Resistenzpro-
blematiken von an bereits bekannten Targets wirkenden herbiziden
25 Wirkstoffen und das ständige Bemühen neue herbizide Wirkstoffe zu
identifizieren, die sich durch einen möglichst breiten Wirkungsbereich,
ökologische und toxikologische Verträglichkeit und/oder
geringe Aufwandmengen auszeichnen.

Die Detektion von neuen Targets ist in der Praxis mit großen
Schwierigkeiten verbunden, da die Hemmung eines Enzyms, das Be-
standteil eines Stoffwechselweges ist, häufig das Wachstum der
Pflanze nicht weiter beeinflusst. Dies kann daran liegen, dass
die Pflanze auf alternative Stoffwechselwege ausweicht, deren Exi-
35 stenz nicht bekannt ist, oder dass das inhibierte Enzym nicht li-
mitierend für den Stoffwechselweg ist. Ferner zeichnen sich
pflanzliche Genome durch eine große funktionelle Redundanz aus.
Im Genom von Arabidopsis thaliana liegen funktional äquivalente
Enzyme im Vergleich zu Insekten oder Säugern häufiger in Genfamili-
40 en vor (Nature, 2000, 408(6814):796-815). Diese Annahme wird
experimentell bestätigt durch die Tatsache, dass grosse Gen-
Knock-out-Programme durch T-DNA- oder Transposoninsertion in Ara-
bidopsis bisher weniger ausgeprägte Phänotypen lieferten als er-
wartet (Curr. Op. Plant Biol. 4, 2001, pp.111-117).

2

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht daher darin, neue Targets zu identifizieren, die für das Wachstum von Pflanzen essentiell sind bzw. deren Inhibierung für die Pflanze zu einem verminderten Wachstum führen, sowie Verfahren bereitzustellen, welche zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider Wirkung geeignet sind.

Die Aufgabe wurde gelöst durch die Verwendung von einem Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer Saccharose-6-Phosphat Phosphatase kodiert durch eine Nukleinsäuresequenz umfassend

- a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:3 oder SEQ ID NO:5 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
- 15 b) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:6 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder
- 20 c) funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 mit einer Identität von mindestens 55% zu der SEQ ID NO:1; oder funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3 mit einer Identität von mindestens 55% zu der SEQ ID NO:3; oder funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz
25 SEQ ID NO:5 mit einer Identität von mindestens 51% zu der SEQ ID NO:5; oder
- d) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:2, das eine
30 Identität mit der SEQ ID NO:2 von mindestens 55% aufweist, ableiten läßt; oder eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents
35 der SEQ ID NO:4, das eine Identität mit der SEQ ID NO:4 von mindestens 54% aufweist, ableiten läßt; oder eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:6, das eine Identität
40 mit der SEQ ID NO:6 von mindestens 54% aufweist, ableiten läßt;

als Target für Herbizide.

45 An dieser Stelle werden nun weitere der in der Beschreibung verwendeten Begriffe definiert.

- "Affinitäts-Tag": Bezeichnet ein Peptid oder Polypeptid, dessen kodierende Nukleinsäuresequenz mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz direkt oder mittels eines Linkers über gängige Klonierungstechniken fusioniert werden kann. Das Affinitäts-Tag dient zur Isolierung, Anreicherung und/oder gezielten Aufreinigung des rekombinanten Zielproteins mittels Affinitäts-Chromatographie aus Gesamtzellextrakten. Der oben erwähnte Linker kann vorteilhaft eine Protease-Schnittstelle (z.B. für Thrombin oder Faktor Xa) enthalten, wodurch das Affinitäts-Tag bei Bedarf vom Zielprotein abgespalten werden kann. Beispiele für gängige Affinitäts-Tags sind das "His-Tag" z.B. von Quiagen, Hilden, "Strep-Tag", das "Myc-Tag" (Invitrogen, Carlsberg), das aus einer Chitin bindenden Domäne und einem Intein bestehende Tag von New England Biolabs, das Maltose-bindende Protein (pMal) von New England Biolabs und das sogenannte CBD-Tag von Novagen. Der Affinitäts-Tag kann dabei am 5'- oder 3'-Ende der kodierenden Nukleinsäuresequenz mit der für das Zielprotein kodierenden Sequenz angebracht sein..
- 20 "Expressionskassette": Eine Expressionskassette enthält eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpft mit mindestens einem genetischen Kontrollelement, wie einem Promotor, sowie vorteilhaft mit einem weiteren Kontrollelement, wie einem Terminator. Die Nukleinsäuresequenz der Expressionskassette kann beispielsweise eine genomische oder eine komplementäre DNA-Sequenz oder eine RNA-Sequenz sowie halb- oder vollsynthetische Analoga davon sein. Diese Sequenzen können in linearer oder zirkulärer Form, extra-chromosomal oder integriert in das Genom vorliegen. Die entsprechenden Nukleinsäuresequenzen können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen werden oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen.
- 35 Auch artifizielle Nukleinsäuresequenzen sind hierbei geeignet, solange sie die Expression eines durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz kodierten Polypeptides mit der biologischen Aktivität einer Saccharose-6-Phosphat Phosphatase in einer Zelle oder einem Organismus ermöglichen. Beispielsweise können synthetische Nukleotid-Sequenzen erzeugt werden, die bezüglich der Kodon-Nutzung des von den zu transformierenden Organismen optimiert wurden.

Alle vorstehend erwähnten Nukleotid-Sequenzen sind in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragment-Kondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleotidbausteine der Doppelhelix

herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise in bekannter Weise nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente so manipuliert werden, dass eine Nukleotid-Sequenz mit korrekter Leserichtung und korrektem Leseraster erhalten wird. Die Verbindung der Nukleinsäure-Fragmente untereinander erfolgt über allgemeine Klonierungstechniken wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1994) beschrieben sind.

"Funktionelle Verknüpfung": Unter einer funktionellen oder operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung regulativer Sequenzen bzw. genetischer Kontrollelemente derart, daß jede der regulativen Sequenzen bzw. jedes der genetischen Kontrollelemente ihre Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

"Funktionelle Äquivalente" beschreiben hier Nukleinsäuresequenzen, die unter Standardbedingungen mit der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 oder SEQ ID NO:5 oder Teilen der SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 oder SEQ ID NO:5 hybridisieren und befähigt sind, die Expression eines Polypeptides mit der biologischen Aktivität einer Saccharose-6-Phosphat Phosphatase in einer Zelle oder einem Organismus zu bewirken.

Zur Hybridisierung werden vorteilhaft kurze Oligonukleotide mit einer Länge von etwa 10-50 bp, vorzugsweise 15-40 bp beispielsweise der konservierten oder sonstigen Bereiche, die über Vergleiche mit anderen verwandten Genen in dem Fachmann bekannter Weise ermittelt werden können, verwendet. Es können aber auch längere Fragmente der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit einer Länge von 100-500 bp oder die vollständigen Sequenzen für die Hybridisierung verwendet werden. Je nach der verwendeten Nukleinsäure/Oligonukleotid, der Länge des Fragmentes oder der vollständige Sequenz oder je nachdem welche Nukleinsäureart, d.h. DNA oder RNA, für die Hybridisierung verwendet werden, variieren diese Standardbedingungen. So liegen beispielsweise die Schmelztemperaturen für DNA:DNA-Hybride ca 10 °C niedriger als die von DNA:RNA-Hybriden gleicher Länge.

Unter Standardhybridisierungsbedingungen sind beispielsweise je nach Nukleinsäure Temperaturen zwischen 42 und 58°C in einer wäßrigen Pufferlösung mit einer Konzentration zwischen 0,1 bis 5 x SSC (1 x SSC = 0,15 M NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,2) oder zusätzlich in Gegenwart von 50 % Formamid wie beispielsweise 42°C in 5 x SSC, 50 % Formamid zu verstehen. Vorteilhafterweise liegen die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 20°C bis 65°C, bevorzugt zwischen etwa 30°C bis 45°C. Für DNA:RNA-Hybride liegen die Hybridisierungsbedingungen vorteilhaft bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 30°C bis 65°C, bevorzugt zwischen etwa 45°C bis 55°C. Diese angegebenen Temperaturen für die Hybridisierung sind beispielsweise kalkuliertete Schmelztemperaturwerte für eine Nukleinsäure mit einer Länge von ca. 100 Nukleotiden und einem G + C-Gehalt von 50 % in Abwesenheit von Formamid. Die experimentellen Bedingungen für die DNA-Hybridisierung sind in einschlägigen Lehrbüchern der Genetik, wie beispielsweise Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, beschrieben und lassen sich nach dem Fachmann bekannten Formeln beispielsweise abhängig von der Länge der Nukleinsäuren, der Art der Hybride oder dem G + C-Gehalt berechnen. Weitere Informationen zur Hybridisierung kann der Fachmann folgenden Lehrbüchern entnehmen: Ausubel et al. (eds), 1985, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York; Hames and Higgins (eds), 1985, "Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, "Essential Molecular Biology: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

Unter einem funktionellen Äquivalent der SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 oder SEQ ID NO:5 versteht man weiterhin auch Nukleinsäuresequenzen die mit der SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 oder SEQ ID NO:5 bis zu einem definierten Prozentsatz homolog bzw. identisch sind und ferner insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen der vorstehend genannten Nukleinsäuresequenzen, die für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer Saccharose-6-Phosphat Phosphatasekodieren.

Es werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfasst, welche man durch Modifikation der vorstehend genannten Nukleinsäuresequenzen erhält. Beispielsweise können solche Modifikationen durch dem Fachmann geläufige Techniken, wie "Site Directed Mutagenesis", "Error Prone PCR", "DNA-shuffling" (Nature 370, 1994, pp.389-391) oder "Staggered Extension Process" (Nature Biotechnol. 16, 1998, pp.258-261) erzeugt werden. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die Einfügung weiterer Restriktionsenzymchnittstellen, die Entfernung

von DNA zur Verkürzung der Sequenz, der Austausch von Nukleotiden zur Codon-Optimierung oder das Hinzufügen weiterer Sequenzen sein. Proteine, die über modifizierte Nukleinsäuresequenzen kodiert werden, müssen trotz abweichender Nukleinsäuresequenz noch
5 die gewünschten Funktionen besitzen.

Der Begriff des funktionellen Äquivalents kann sich auch auf das durch die entsprechende Nukleinsäuresequenz kodierte Aminosäuresequenz beziehen. In diesem Fall beschreibt der Begriff funktionelles Äquivalent ein Protein, dessen Aminosäuresequenz mit der
10 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:6 bis zu einem definierten Prozentsatz identisch bzw. homolog ist.

Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an den Kodon-Gebrauch adaptierte Nukleinsäuresequenzen bzw. die davon abgeleiteten Aminosäuresequenzen.
15

20 "Genetische Kontrollsequenz" beschreibt Sequenzen, die einen Einfluss auf die Transkription und gegebenenfalls Translation der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren in prokaryotischen oder eukaryontischen Organismen haben. Beispiele hierfür sind Promotoren, Terminatoren oder sogenannte "enhancer" Sequenzen. Zusätzlich zu
25 diesen Kontrollsequenzen oder anstelle dieser Sequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch so modifiziert worden sein, dass die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression des Zielgens modifiziert, also erhöht
30 oder erniedrigt wurde. Die Auswahl der Kontrollsequenz erfolgt abhängig vom Wirtsorganismus oder Ausgangsorganismus. Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untranslatierte Region, Introns oder die nichtkodierende 3'-Region von Genen. Als Kontrollsequenzen sind weiterhin solche zu verstehen, die eine
35 homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines Wirtsorganismus ermöglichen oder die Entfernung aus dem Genom erlauben. Genetische Kontrollsequenzen umfassen auch weitere Promotoren, Promotorelemente oder Minimalpromotoren, sowie die Chromatinstruktur beeinflussende Sequenzen (z.B. Matrix attachment regions
40 (MAR's)) die die expressionssteuernden Eigenschaften modifizieren können. So kann durch genetische Kontrollsequenzen zum Beispiel die gewebespezifische Expression zusätzlich abhängig von bestimmten Stressfaktoren erfolgen. Entsprechende Elemente sind zum Beispiel für Wasserstress, Abscisinsäure (Lam E und Chua NH, J Biol
45 Chem 1991; 266(26): 17131 -17135), Kälte- und Trockenstress

7

(Plant Cell 1994, (6): 251-264) und Hitzestress (Molecular & General Genetics, 1989, 217(2-3): 246-53) beschrieben.

"Homologie" zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen oder Polypeptidsequenzen wird durch die Identität der Nukleinsäuresequenz/Polypeptidsequenz über die jeweils gesamte Sequenzlänge definiert, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus ClustalW (Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) Nucleic Acids Res. 22:4673-80) unter Einstellung folgender Parameter:

10

GAP Penalty 15.00 : DNA transition weight: 0.5
GAP Length Penalty 6.66 Protein weight matrix: Gonnet Series
Delay divergent Seqs (%) 30 DNA weight matrix: IUB

berechnet wird.

Anstelle des Begriff "homolog" oder "Homologie" wird im Folgenden auch gleichbedeutend der Begriff Identität verwendet.

20 "Mutationen" von Nuklein- oder Aminosäuresequenzen umfassen Substitutionen (=Ersetzungen), Additionen (Hinzufügung), Deletionen (Löschung), Inversion (Veränderungen) oder Insertionen (Einfügungen) eines oder mehrerer Nukleotidreste, wodurch sich auch die entsprechende Aminosäuresequenz des Zielproteins mittels Substitution, Insertion oder Deletion einer oder mehrerer Aminosäuren verändern kann, wobei jedoch insgesamt die funktionellen Eigenschaften des Zielproteins im wesentlichen beibehalten werden.

"Natürliche genetische Umgebung" meint den natürlichen chromosomalen Locus in dem Herkunftsorganismus. Im Fall einer genomischen Bibliothek ist die natürliche genetische Umgebung der Nukleinsäuresequenz bevorzugt zumindest noch teilweise erhalten. Die Umgebung flankiert die Nukleinsäuresequenz zumindest an 5'- oder 3'-Seite und hat eine Sequenzlänge von mindestens 50 bp, bevorzugt mindestens 100 bp, besonders bevorzugt mindestens 500 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 1000 bp, am meisten bevorzugt mindestens 5000 bp.

"Pflanzen" im Sinne der Erfindung sind Pflanzenzellen, -gewebe, -organe oder ganzen Pflanzen wie Samen, Knollen, Blüten, Pollen, Früchte, Sämlinge, Wurzeln, Blätter, Stengel oder sonstige Pflanzenteile zu verstehen. Außerdem ist unter Pflanzen Vermehrungsmaterial wie Samen, Früchte, Sämlinge, Stecklinge, Knollen, Schnitte oder Wurzelstöcke zu verstehen.

"Reaktionszeit" bezeichnet die Zeit, die man für die Durchführung eines Aktivitätstests bis zum Erhalt einer signifikanten Aussage über eine Aktivität benötigt und hängt sowohl von der spezifischen Aktivität des im Test eingesetzten Proteins als auch von der verwendeten Methode und der Empfindlichkeit der verwendeten Geräte ab. Dem Fachmann ist die Ermittlung der Reaktionszeiten bekannt. Bei auf photometrischen Methoden basierenden Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider Wirkung liegen die Reaktionszeiten beispielsweise im allgemeinen zwischen > 0 bis 10 120 Minuten.

"Rekombinante DNA" beschreibt eine Kombination von DNA-Sequenzen herstellbar durch rekombinante DNA-Technologie.

15 "Rekombinate DNA-Technologie": allgemein bekannte Techniken zur Fusionierung von DNA-Sequenzen (z.B. beschrieben in Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbour, NY, Cold Spring Harbour Laboratory Press).

20 "Replikationsursprünge" gewährleisten die Vermehrung der erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder Vektoren in Mikroorganismen und Hefen z.B. der pBR322 ori oder der P15A ori in E. coli (Sambrook et al.: "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 25 1989) und der ARS1 ori in Hefe (Nucleic Acids Research, 2000, 28(10): 2060-2068).

"Reportergene" kodieren für leicht quantifizierbare Proteine. Über Wachstums-, Fluoreszenz-, Chemo-, Biolumineszenz- oder Resistenzassay oder über eine photometrische Messung (Eigenfarbe) oder Enzymaktivität kann mittels dieser Gene eine Bewertung der Transformationseffizienz oder des Expressionsortes oder -zeitpunktes vorgenommen werden. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Reporter-Proteine (Schenborn E, Groskreutz D. Mol Biotechnol. 30 1999; 13(1):29-44) wie das "green fluorescence protein" (GFP) (Gerdes HH and Kaether C, FEBS Lett. 1996; 389(1):44-47; Chui WL et al., Curr Biol 1996, 6:325-330; Leffell SM et al., Biotechniques. 23(5):912-8, 1997), die Chloramphenicolacetyltransferase, eine Luziferase (Giacomin, Plant Sci 1996, 116:59-72; Scikantha, 35 J Bact 1996, 178:121; Millar et al., Plant Mol Biol Rep 1992 10:324-414), sowie Luziferasegene, im allgemeinen die β -Galactosidase oder die β -Glucuronidase (Jefferson et al., EMBO J. 1987, 6, 3901-3907) oder das Ura3-Gen.

45 "Selektionsmarker" verleihen eine Resistenz gegen Antibiotika, oder andere toxische Verbindungen: Beispielhaft zu nennen seien hier das Neomycin-Phosphotransferase-Gen, das eine Resistenz ge-

gen die Aminoglycosid-Antibiotika Neomycin (G 418), Kanamycin, Paromycin (Deshayes A et al., EMBO J. 4 (1985) 2731-2737), das sul Gen kodierend für eine mutierte Dihydropteroat Synthase (Guerineau F et al., Plant Mol Biol. 1990; 15(1):127-136), das Hygro-
5 mycin B Phosphotransferase-Gen (Gen Bank Accession NO: K 01193) und das shble Resistenzgen, das eine Resistenz gegen die Bleomycin Antibiotika wie zB. Zeocin verleiht. Weitere Beispiele für Selektionsmarker-Gene sind Gene, die eine Resistenz gegen 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456) oder Phosphinotricin etc. ver-
10 leihen oder solche, die eine Antimetaboliten-Resistenz verleihen, zum Beispiel das dhfr-Gen (Reiss, Plant Physiol. (Life Sci. Adv.) 13 (1994) 142-149). Geeignet sind ferner Gene wie trpB oder hisD (Hartman SC and Mulligan RC, Proc Natl Acad Sci U S A. 85 (1988) 8047-8051). Geeignet ist auch das Gen der Mannose-Phosphat Iso-
merase (WO 94/20627), das ODC (Ornithin-Decarboxylase) Gen (McConlogue, 1987 in: Current Communications in Molecular Bio-
logy, Cold Spring Harbor Laboratory, Hrsg.) oder die Deaminase aus Aspergillus terreus (Tamura K et al., Biosci Biotechnol Biochem. 59 (1995) 2336-2338).

20

"Transformation" beschreibt einen Prozess zur Einführung heterologer DNA in eine pro- oder eukaryontische Zelle. Mit einer transformierten Zelle ist nicht nur das Produkt des Transformationsprozesses an sich beschrieben, sondern auch alle transgenen

25 Nachkommen des durch die Transformation hergestellten transgenen Organismus

"Target/Target Protein": ein Polypeptid codiert über die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, welches ein Enzym im klassischen Sinne sein kann oder z.B. ein Strukturprotein, ein für Entwicklungsprozesse relevantes Protein, Regulationsproteine wie Transkriptionsfaktoren, Kinasen, Phosphatasen, Rezeptoren, Untereinheiten von Kanälen, Transportproteine, regulatorische Untereinheiten die einem Enzymkomplex eine substrat- oder Aktivitätsregulation verleihen. Allen Targets oder Wirkorten gemein ist dabei,
35 dass deren funktionale Anwesenheit essentiell für das Überleben oder die normale Entwicklung und das Wachstum sind.

"Transgen": Bezogen auf eine Nukleinsäuresequenz, eine Expressionskassette oder einen Vektor enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder einen Organismus transformiert mit der vorstehend genannten Nukleinsäuresequenz, Expressionskassette oder Vektor beschreibt der Ausdruck transgen alle solche durch gentechnische Methoden hergestellten Konstruktionen, in denen
40 sich entweder die Nukleinsäuresequenz des Zielproteins oder eine mit der Nukleinsäuresequenz des Zielproteins funktionell verknüpfte genetische Kontrollsequenz oder eine Kombination der
45

10

vorstehend genannten Möglichkeiten sich nicht in ihrer natürlichen genetischen Umgebung befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden. Die Modifikation kann hier beispielsweise über Mutation eines oder mehrerer Nukleotidreste der entsprechenden Nukleinsäuresequenz erreicht werden.

Saccharose-6-phosphat Phosphatase, ein im Cytosol lokalisiertes Enzym der Saccharose-Biosynthese, katalysiert die Umwandlung von Saccharose-6-phosphat zu Orthophosphat und Saccharose. Saccharose-6-phosphat stammt aus der von der Saccharose-6-phosphat Synthase katalysierten Reaktion, in der UDP-Glukose und Fructose-6-phosphat zu Saccharose-6-phosphat umgewandelt werden. Neuere Daten sprechen für eine Assoziation der Saccharose-6-phosphat Synthase und Saccharose-6-phosphat Phosphatase in einem Proteinkomplex (Eccheveria et al. 1997, Plant Physiology 115, 223), was auf eine regulatorische Funktion der Saccharose-6-phosphat Phosphatase hindeuten könnte. Ob die Saccharose-6-phosphat Phosphatase für die Pflanze essentiell ist, ist nicht bekannt.

20

Die Klonierung von Saccharose-6-phosphat Phosphatase kodierenden Genen aus verschiedenen Pflanzspezies ist in der Literatur beschrieben (Lunn et al., 2000, Procl. Natl. Acad. Sci. USA 97: 12914), wobei es allerdings keine Untersuchungen zur in planta Funktion des Enzyms gibt.

30

Bekannt sind drei für Saccharose-6-Phosphat Phosphatase kodierende Nukleinsäuresequenzen sowie Proteinsequenzen aus *Arabidopsis thaliana*, Gen Bank Acc. No AF 283565 und AAG31075 (Identität zur Seq ID NO:1 = 68%; Identität zur Seq ID NO:2 = 72%; Identität zur SEQ ID NO:3 = 68%; Identität zur Seq ID NO:4 = 72%; Identität zur SEQ ID NO:5 = 61%; Identität zur Seq ID NO:6 = 71%), Gen. Bank Acc. No. AF434711 und AAL30747 (Identität zur Seq ID NO:1 = 55%; Identität zur Seq ID NO:2 = 55%; Identität zur SEQ ID NO:3 = 56%; Identität zur Seq ID NO:4 = 54%; Identität zur SEQ ID NO:5 = 51%; Identität zur Seq ID NO:6 = 54%) sowie Gen. Bank Acc. No. AF356816 und AAK40235 (Identität zur Seq ID NO:1 = 62%; Identität zur Seq ID NO:2 = 60%; Identität zur SEQ ID NO:3 = 63%; Identität zur Seq ID NO:4 = 61%; Identität zur SEQ ID NO:5 = 59%, Identität zur Seq ID NO:6 = 60%), drei für Saccharose-6-Phosphat Phosphatase kodierende Nukleinsäuresequenzen aus *Triticum aestivum*, Gen Bank Acc. No AY029159 und AAK31789 (Identität zur Seq ID NO:1 = 62%; Identität zur Seq ID NO:2 = 64%; Identität zur SEQ ID NO:3 = 61%; Identität zur Seq ID NO:4 = 64%; Identität zur SEQ ID NO:5 = 56%; Identität zur Seq ID NO:6 = 64%), Gen. Bank Acc. No. AF321557 und AAK09372 (Identität zur Seq ID NO:1 = 61%; Identität zur Seq ID NO:2 = 64%; Identität zur SEQ ID NO:3 = 60%; Identität zur Seq ID

35

40

45

11

NO:4 = 64%; Identität zur SEQ ID NO:5 = 60%; Identität zur Seq ID NO:6 = 64%) sowie Gen. Bank Acc. No. AF321556 und AAK09371 (Identität zur Seq ID NO:1 = 67%; Identität zur Seq ID NO:2 = 64%; Identität zur SEQ ID NO:3 = 60%; Identität zur Seq ID NO:4 = 64%;
5 Identität zur SEQ ID NO:5 = 61%; Identität zur Seq ID NO:6 = 64%), eine Saccharose-6-Phosphat Phosphatase kodierende Nukleinsäuresequenzen aus *Medicago trunculata*, Gen Bank Acc. No AF283566 und AAG31076 (Identität zur Seq ID NO:1 = 67%; Identität zur Seq ID NO:2 = 67%; Identität zur SEQ ID NO:3 = 67%; Identität zur Seq
10 ID NO:4 = 69%; Identität zur SEQ ID NO:5 = 62%; Identität zur Seq ID NO:6 = 66%) und eine Saccharose-6-Phosphat Phosphatase kodierende Nukleinsäuresequenzen aus *Zea mays*, Gen Bank Acc. No AAG31074 (Identität zur Seq ID NO:2 = 62%; Identität zur Seq ID NO:4 = 63%; Identität zur Seq ID NO:6 = 63%).

5 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde überraschenderweise gefunden, dass Pflanzen, in denen gezielt die Aktivität der Saccharose-6-Phosphat Phosphatase verringert wurde Phänotypen aufwiesen, die mit durch Herbizidapplikation erzeugten Phänotypen
20 vergleichbar sind. Beobachtet wurden Wachstumsretardierungen und chlorotische Blätter sowie in einigen Fällen das Absterben ganzer Pflanzen oder von Pflanzenteilen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von einem Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer Saccharose-6-Phosphat Phosphatase kodiert durch eine Nukleinsäuresequenz umfassend
25

- a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:3 oder SEQ ID NO:5 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
- b) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:6 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder
35
- c) funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 mit einer Identität von mindestens 55% zu der SEQ ID NO:1; funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3 mit einer Identität von mindestens 55% zu der SEQ ID NO:3; oder funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:5 mit einer Identität von mindestens 51% zu der SEQ ID NO:5;
40
- d) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:2, das eine
45

12

Identität mit der SEQ ID NO:2 von mindestens 55% aufweist, ableiten läßt; oder eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:4, das eine Identität mit der SEQ ID NO:4 von mindestens 54% aufweist, ableiten läßt; oder eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:6, das eine Identität mit der SEQ ID NO:6 von mindestens 54% aufweist, ableiten läßt;

als Target für Herbizide. Die funktionellen Äquivalente nach c) und d) zeichnen sich durch eine gleiche Funktionalität aus, d.h. sie haben die physiologische Funktion einer Saccharose-6-Phosphat Phosphatase.

Die oben genannten Nukleinsäuresequenzen stammen vorzugsweise aus einer Pflanze z.B. aus einer Pflanze aus der Familie der Solanaceae.

Die erfindungsgemäßen funktionellen Äquivalente der SEQ ID NO:1 weisen eine Homologie mit der SEQ ID No:1 von mindestens 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68% vorzugsweise mindestens 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74% vorzugsweise mindestens 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83% bevorzugt mindestens 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93% besonders bevorzugt mindestens 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% auf.

Die erfindungsgemäßen funktionellen Äquivalente der SEQ ID NO:2 weisen eine Homologie mit der SEQ ID No:2 von mindestens 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64% vorzugsweise mindestens 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, vorzugsweise mindestens 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83% bevorzugt mindestens 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93% besonders bevorzugt mindestens 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% auf.

Die erfindungsgemäßen funktionellen Äquivalente der SEQ ID NO:3 weisen eine Homologie mit der SEQ ID No:3 von mindestens 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68% vorzugsweise mindestens 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74% vorzugsweise mindestens 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83% bevorzugt mindestens 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93% besonders bevorzugt mindestens 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% auf.

13

Die erfindungsgemäßen funktionellen Äquivalente der SEQ ID NO:4 weisen eine Homologie mit der SEQ ID No:4 von mindestens 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62% vorzugsweise mindestens 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72% vorzugsweise
5 mindestens 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82% bevorzugt mindestens 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93% besonders bevorzugt mindestens 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% auf.

10 Die erfindungsgemäßen funktionellen Äquivalente der SEQ ID NO:5 weisen eine Homologie mit der SEQ ID No:5 von mindestens 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62% vorzugsweise mindestens 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74% vorzugsweise mindestens 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83% bevorzugt mindestens 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93% besonders bevorzugt mindestens 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% auf.

Die erfindungsgemäßen funktionellen Äquivalente der SEQ ID NO:6
20 weisen eine Homologie mit der SEQ ID No:6 von mindestens 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64% vorzugsweise mindestens 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71% vorzugsweise mindestens 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83% bevorzugt mindestens 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 89%, 90%,
25 91%, 92%, 93% besonders bevorzugt mindestens 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% auf.

Weiterhin werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung Nukleinsäuresequenzen beansprucht kodierend für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer Saccharose-6-Phosphat Phosphatase umfassend:

- a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3
oder SEQ ID NO:5 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

35

b) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:6 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder

40

c) funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 mit einer Identität von mindestens 69% zu der SEQ ID NO:1; oder funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3 mit einer Identität von mindestens 69% zu der SEQ ID
.. 45 NO:3; oder funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz

SEQ ID NO:5 mit einer Identität von mindestens 63% zu der SEQ ID NO:5; oder

- d) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:2, das eine Identität mit der SEQ ID NO:2 von mindestens 73% aufweist, ableiten läßt; oder eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:4, das eine Identität mit der SEQ ID NO:4 von mindestens 73% aufweist, ableiten läßt; oder eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:6, das eine Identität mit der SEQ ID NO:6 von mindestens 72% aufweist, ableiten läßt.

Die oben genannten Nukleinsäuresequenzen stammen aus einer Pflanze z.B. aus einer Pflanze aus der Familie der Solanaceae.

Ebenfalls beansprucht werden die durch die vorstehend genannten Nukleinsäuresequenzen kodierten Polypeptide. Die funktionellen Äquivalente nach c) und d) zeichnen sich durch eine gleiche Funktionalität aus, d.h. sie haben die physiologische Funktion einer Saccharose-6-Phosphat Phosphatase.

Die erfindungsgemäßen funktionellen Äquivalente der SEQ ID NO:1 weisen eine Identität mit der SEQ ID No:1 von mindestens 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74% vorzugsweise mindestens 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83% bevorzugt mindestens 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93% besonders bevorzugt mindestens 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% auf.

Die erfindungsgemäßen funktionellen Äquivalente der SEQ ID NO:2 weisen eine Identität mit der SEQ ID No:2 von mindestens 73% vorzugsweise mindestens 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83% bevorzugt mindestens 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93% besonders bevorzugt mindestens 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% auf.

Die erfindungsgemäßen funktionellen Äquivalente der SEQ ID NO:3 weisen eine Identität mit der SEQ ID No:3 von mindestens 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74% vorzugsweise mindestens 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83% bevorzugt mindestens 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93% besonders bevorzugt mindestens 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% auf.

15

Die erfindungsgemäßen funktionellen Äquivalente der SEQ ID NO:4 weisen eine Identität mit der SEQ ID No:4 von mindestens 73% vorzugsweise mindestens 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83% bevorzugt mindestens 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 89%, 90%, 5 91%, 92%, 93% besonders bevorzugt mindestens 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% auf.

Die erfindungsgemäßen funktionellen Äquivalente der SEQ ID NO:5 weisen eine Identität mit der SEQ ID No:5 von mindestens 63%, 10 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74% vorzugsweise mindestens 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83% bevorzugt mindestens 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93% besonders bevorzugt mindestens 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% auf.

Die erfindungsgemäßen funktionellen Äquivalente der SEQ ID NO:6 weisen eine Identität mit der SEQ ID No:6 von mindestens 72%, 73% vorzugsweise mindestens 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83% bevorzugt mindestens 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 89%, 20 90%, 91%, 92%, 93% besonders bevorzugt mindestens 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% auf.

Die Nukleinsäuresequenzen kodierend für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer Saccharose-6-Phosphat Phosphatase 25 umfassend

- a) eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:3 oder SEQ ID NO:5 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder
- b) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:6 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder
- 35 c) funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 mit einer Identität von mindestens 55% zu der SEQ ID NO:1; oder funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3 mit einer Identität von mindestens 55% zu der SEQ ID NO:3; oder funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz 40 SEQ ID NO:5 mit einer Identität von mindestens 51% zu der SEQ ID NO:5; oder
- d) funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 mit einer Identität von mindestens 69% zu der SEQ ID NO:1; .. 45 oder funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID

16

NO:3 mit einer Identität von mindestens 69% zu der SEQ ID NO:3; oder funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:5 mit einer Identität von mindestens 63% zu der SEQ ID NO:5; oder

5

- e) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:2, das eine Identität mit der SEQ ID NO:2 von mindestens 73% aufweist, ableiten läßt; oder eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:4, das eine Identität mit der SEQ ID NO:4 von mindestens 73% aufweist, ableiten läßt; oder eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:6, das eine Identität mit der SEQ ID NO:6 von mindestens 72% aufweist, ableiten läßt; oder

10

15

20

- f) eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:2, das eine Identität mit der SEQ ID NO:2 von mindestens 55% aufweist, ableiten läßt; oder eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:4, das eine Identität mit der SEQ ID NO:4 von mindestens 54% aufweist, ableiten läßt; oder eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:6, das eine Identität mit der SEQ ID NO:6 von mindestens 54% aufweist, ableiten läßt;

25

30

35

werden im folgenden als "erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenzen" bezeichnet. Die durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz kodierten Polypeptide mit der biologischen Aktivität einer Saccharose-6-Phosphat Phosphatase werden im folgenden der Einfachheit halber als "SSP" bezeichnet.

40

SSPs verursachen in reduzierter Menge Wachstumsretardierungen sowie nekrotische Blätter in Pflanzen. Eine Reduktion des Polypeptides bedeutet, daß die Menge des Polypeptides über gentechnische Methoden reduziert wird. Verglichen wird eine derartig modifizierte Pflanze mit einer Pflanze, die bezüglich dieses Polypeptides keine genetischen Modifikationen aufweist, ansonsten aber mit

45

dem Genotyp der genetisch manipulierten Pflanze identisch ist unter identischen Wachstumsbedingungen.

Die Genprodukte der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren stellen neue
5 Targets für Herbizide dar, welche die Bereitstellung neuer Herbizide zur Bekämpfung unerwünschter Pflanzen ermöglichen.

Unter unerwünschten Pflanzen sind im weitesten Sinne alle Pflanzen zu verstehen, die an Orten aufwachsen, an denen sie uner-
10 wünscht sind, zum Beispiel:

Dikotyle Unkräuter der Gattungen: *Sinapis*, *Lepidium*, *Galium*, *Stellaria*, *Matricaria*, *Anthemis*, *Galinsoga*, *Chenopodium*, *Urtica*, *Senecio*, *Amaranthus*, *Portulaca*, *Xanthium*, *Convolvulus*, *Ipomoea*, *Polygonum*, *Sesbania*, *Ambrosia*, *Cirsium*, *Carduus*, *Sonchus*, *Solanum*, *Rorippa*, *Rotala*, *Lindernia*, *Lamium*, *Veronica*, *Abutilon*, *Emex*, *Datura*, *Viola*, *Galeopsis*, *Papaver*, *Centaurea*, *Trifolium*, *Ranunculus*, *Taraxacum*.

20 Monokotyle Unkräuter der Gattungen: *Echinochloa*, *Setaria*, *Panicum*, *Digitaria*, *Phleum*, *Poa*, *Festuca*, *Eleusine*, *Brachiaria*, *Lolium*, *Bromus*, *Avena*, *Cyperus*, *Sorghum*, *Agropyron*, *Cynodon*, *Monochoria*, *Fimbristylis*, *Sagittaria*, *Eleocharis*, *Scirpus*, *Paspalum*, *Ischaemum*, *Sphenoclea*, *Dactyloctenium*, *Agrostis*, *Alopecurus*,
25 *Apera*.

Die SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 oder SEQ ID NO:5 oder Teile der vorstehend genannten Nukleinsäuresequenzen können für die Herstellung von Hybridisierungssonden verwendet werden, über welche die entsprechenden Vollängengene bzw. funktionelle Äquivalente der SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 oder SEQ ID NO:5 isoliert werden können. Die Herstellung dieser Sonden sowie die Durchführung der Experimente ist bekannt. Sie kann zum Beispiel über die gezielte Herstellung radioaktiver oder nicht radioaktiver Sonden mittels PCR
35 und der Verwendung von entsprechend markierten Oligonukleotiden mit anschließenden Hybridisierungsexperimenten erfolgen. Die hierfür erforderlichen Technologien sind beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) aufgeführt. Die entsprechenden Sonden können weiterhin mittels Standardtechnologien (Lit. SDM bzw. random Mutagenesis) so modifiziert werden, dass sie für weitere Zwecke eingesetzt werden können, z.B. als Sonde, die spezifisch zu mRNA sowie den entsprechenden codierenden Sequenzen hybridisiert zwecks Ana-
45 lyse der entsprechenden Sequenzen in anderen Organismen.

18

Des weiteren können die oben genannten Sonden für die Detektion und Isolation von funktionellen Äquivalenten der SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 oder SEQ ID NO:5 aus anderen Pflanzenspezies aufgrund von Sequenzidentitäten verwendet werden. Hierbei wird ein Teil oder

5 die gesamte Sequenz der entsprechenden SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 oder SEQ ID NO:5 als Sonde zum Screening in einer genomischen oder cDNA Bank der entsprechenden Pflanzenspezies oder in einer Computer-Recherche nach Sequenzen funktioneller Äquivalente in elektronischen Datenbanken verwendet.

10

Bevorzugte Pflanzenspezies sind hierbei die bereits eingangs erwähnten unerwünschten Pflanzen.

15

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Expressionskassetten

enthaltend

a) genetische Kontrollsequenzen in funktioneller Verknüpfung mit einer Nukleinsäuresequenz umfassend

20

i. eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 oder SEQ ID NO:5 dargestellten Nukleinsäuresequenz; oder

25

ii. eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung aus der in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:6 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten läßt; oder

30

iii. funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:1 mit einer Identität von mindestens 69% zu der SEQ ID NO:1; oder funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:3 mit einer Identität von mindestens 69% zu der SEQ ID NO:3; oder funktionelle Äquivalente der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:5 mit einer Identität von

35 mindestens 63% zu der SEQ ID NO:5; oder

40

iv. eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:2, das eine Identität mit der SEQ ID NO:2 von mindestens 73% aufweist, ableiten läßt; oder eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:4, das eine

45 Identität mit der SEQ ID NO:4 von mindestens 73% aufweist, ableiten läßt; oder eine Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch

19

Rückübersetzung der Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents der SEQ ID NO:6, das eine Identität mit der SEQ ID NO:6 von mindestens 72% aufweist, ableiten läßt; oder

5

- b) zusätzliche Funktionselemente; oder
- c) eine Kombination aus a) und b);

10 sowie die Verwendung von Expressionskassetten enthaltend

- a) genetische Kontrollsequenzen in funktioneller Verknüpfung mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz;
- b) zusätzliche Funktionselemente; oder
- c) eine Kombination aus a) und b);

zur Expression einer SSP, die in vitro Testsystemen verwendet
20 werden kann. Beide Ausführungsformen der vorstehend beschriebenen Expressionskassetten werden im folgenden als erfindungsgemäße Expressionskassette bezeichnet.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine erfindungsgemäße Expressionskassette am 5'-Ende der kodierenden Sequenz einen
25 Promotor und am 3'-Ende Transkriptions-Terminations-Signal und gegebenenfalls weitere genetische Kontrollsequenzen, welche mit der dazwischenliegenden erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpft sind.

Unter den erfindungsgemäßen Expressionskassetten sind auch Analoga zu verstehen, die zum Beispiel durch eine Kombination der einzelnen Nukleinsäuresequenzen auf einem Polynukleotid (Mehrfachkonstrukte), auf mehreren Polynukleotiden in einer Zelle (Ko-
35 transformation) oder durch sequenzielle Transformation zustande kommen können.

Vorteilhafte genetische Kontrollsequenzen nach Punkt a) für die erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder für Vektoren enthal-
40 tend erfindungsgemäße Expressionskassetten sind beispielsweise Promotoren wie cos-, tac-, trp-, tet-, lpp-, lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, λ -PR- oder im λ -PL-Promotor, die zur Expression der SSP in gram-negativen Bakterienstämmen verwendet werden können.

20

Weitere vorteilhafte genetische Kontrollsequenzen sind beispielsweise in den Promotoren amy und SPO2, die zur Expression der SSP in gram-positiven Bakterienstämmen verwendet werden können, sowie in den Hefe- oder Pilzpromotoren AUG1, GPD-1, PX6, TEF, CUP1, PGK, GAP1, TPI, PHO5, AOX1, GAL10/CYC1, CYC1, OliC, ADH, TDH, Kex2, MFA oder NMT oder Kombinationen der vorstehend genannten Promotoren enthalten (Degryse et al., Yeast 1995 Jun 15; 11(7):629-40; Romanos et al. Yeast 1992 Jun;8(6):423-88; Benito et al. Eur. J. Plant Pathol. 104, 207-220 (1998); Cregg et al. Biotechnology (N Y) 1993 Aug;11(8):905-10; Luo X., Gene 1995 Sep 22;163(1):127-31; Nacken et al., Gene 1996 Oct 10;175(1-2): 253-60; Turgeon et al., Mol Cell Biol 1987 Sep;7(9):3297-305) oder den Transkriptionsterminatoren NMT, Gcyl, TrpC, AOX1, nos, PGK oder CYC1 (Degryse et al., Yeast 1995 Jun 15; 11(7):629-40; Brunelli et al. Yeast 1993 Dec9(12): 1309-18; Frisch et al., Plant Mol. Biol. 27 (2), 405-409 (1995); Scorer et al., Biotechnology (N.Y.) 12 (2), 181-184 (1994), Genbank acc. number Z46232; Zhao et al. Genbank acc number : AF049064; Punt et al., (1987) Gene 56 (1), 117-124), die zur Expression der SSP in Hefestämmen verwendet werden können.

Als zur Expression in Insektenzellen geeignete genetische Kontrollsequenzen sind exemplarisch der Polyhedrin-Promotor sowie der p10-Promotor (Luckow, V.A. and Summers, M.D. (1988) Bio/Techn. 6, 47-55) zu nennen.

Vorteilhafte genetische Kontrollsequenzen zur Expression der SSP in Zellkultur sind neben Polyadenylierungssequenzen wie z.B. aus Simian Virus 40 eukaryontische Promotoren viralen Ursprungs wie z.B. Promotoren des Polyoma, Adenovirus 2, Cytomegalovirus oder Simian Virus 40.

Weitere vorteilhafte genetische Kontrollsequenzen zur Expression der SSP in Pflanzen sind in den Pflanzenpromotoren CaMV/35S [Franck et al., Cell 21(1980) 285-294], PRP1 [Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993)], SSU, OCS, LEB4, USP, STLS1, B33, NOS; FBPaseP (WO 98/18940) oder im Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor enthalten, vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt sind Promotoren viralen Ursprungs wie der Promotor des 35S-Transkriptes des Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285-294; Odell et al., Nature 313 (1985), 810-812). Weitere bevorzugte konstitutive Promotoren sind zum Beispiel der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al., Plant Mol Biol 1995, 29:637-649), die Promotoren der vakuolärer ATPase

Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991).

Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor als genetische Kontrollsequenz enthalten, durch den die Expression des exogenen Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), ein durch Salicylsäure induzierbarer (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer (EP-A-0388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor können ebenfalls verwendet werden.

Geeignet sind ferner Promotoren die eine gewebe- oder organspezifische Expression z.B. in Antheren, Ovarien, Blüten und Blütenorganen, Blättern, Schließzellen, Trichomen, Stengel, Leitgeweben, Wurzeln und Samen vermitteln. Ebenfalls geeignet sind hier neben den oben genannten konstitutiven Promotoren, insbesondere solche Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445 - 245). Bevorzugt sind ferner Promotoren, die eine Expression in Samen und pflanzlichen Embryonen steuern. Samenspezifische Promotoren sind zum Beispiel der Promotor des Phaseolins (US 5,504,200, Bustos MM et al., Plant Cell. 1989;1(9):839-53), des 2S Albumingens (Joseffson LG et al., J Biol Chem 1987, 262:12196-12201), des Legumins (Shirsat A et al., Mol Gen Genet. 1989;215(2):326-331), des USP (unknown seed protein; Bäumlein H et al., Molecular & General Genetics 1991, 225(3):459-67) des Napin Gens (Stalberg K, et al., L. Planta 1996, 199:515-519), des Saccharosebindepoteins (WO 00/26388) oder der LeB4-Promotor (Bäumlein H et al., Mol Gen Genet 1991, 225: 121-128; Fiedler, U. et al., Biotechnology (NY) (1995), 13 (10) 1090).

Weitere als genetische Kontrollsequenzen geeignete Promotoren sind beispielsweise spezifische Promotoren für Knollen, Speicherwurzeln oder Wurzeln, wie beispielsweise der Patatin Promotor Klasse I (B33), der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel, der Promotor der Stärke Synthase (GBSS1) oder der Sporamin Promotor, fruchtspezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtspezifische Promotor aus Tomate (EP-A 409625), fruchtreifung-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifung-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794), blüten-

22

spezifische Promotoren, wie beispielsweise der Phytoen Synthase Promotor (WO 92/16635) oder der Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593) oder spezifische Plastiden- oder Chromoplasten-Promotoren, wie beispielsweise der RNA-Polymerase Promotor (WO 97/06250) oder auch der Promotor der Phosphoribosylpyrophosphat Amidotransferase aus Glycine max (siehe auch Genbank Accession Nr U87999) oder ein anderer Nodien-spezifischer Promotor wie in EP-A 249676 können vorteilhaft verwendet werden.

- 10 Unter zusätzlichen Funktionselementen b) sind beispielhaft aber nicht einschränkend Reportergene, Replikationsursprünge, Selektionsmarker und sogenannte Affinitäts-Tags, fusioniert mit der SSP direkt oder mittels eines Linkers optional enthaltend eine Protease-Schnittstelle zu verstehen. Weitere geeignete zusätzli-
- 15 che Funktionselemente sind Sequenzen, die ein Targeting in den Apoplasten, in Plastiden, die Vakuole, das Mitochondrium, das Peroxisom, das Endoplasmatische Retikulum (ER) oder durch ein Fehlen entsprechender operativer Sequenzen einen Verbleib im Kompartiment des Entstehens, dem Zytosol, gewährleisten (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996), 285-423).

Erfindungsgemäß sind ferner Vektoren, die mindestens eine Kopie der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen und/oder der erfindungsgemäßen Expressionskassetten enthalten.

25

Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Viren wie SV40, CMV, Baculovirus, Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Phagemide, Cosmide, lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden bevorzugt ist eine chromosomale Replikation.

30

In einer weiteren Ausgestaltungsform des Vektors kann die

35 erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt auch vorteilhafterweise in Form einer linearen DNA in die Organismen eingeführt werden und über heterologe oder homologe Rekombination in das Genom des Wirtsorganismus integriert werden. Diese lineare DNA kann aus einem linearisierten Plasmid oder nur aus dem Nukleinsäure-

40 konstrukt als Vektor oder den verwendeten Nukleinsäuresequenzen bestehen.

Weitere prokaryotische und eukaryotische Expressionssysteme sind genannt in Kapitel 16 und 17 in Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor,

45

23

NY, 1989. Weitere vorteilhafte Vektoren werden in Hellens et al. (Trends in plant science, 5, 2000) beschrieben.

Die erfindungsgemäße Expressionskassette sowie davon abgeleitete Vektoren können zur Transformation von Bakterien, Cyanobakterien (z.B. der Gattung Synechocystes, Anabaena, Calothrix, Scytonema, Oscillatoria, Plectonema und Nostoc), Proteobakterium wie etwa Magnetococcus sp. MC1, Hefen, filamentösen Pilzen und Algen und eukaryontischen, nicht humanen Zellen (z.B. Insektenzellen) mit dem Ziel der rekombinanten Herstellung der SSP eingesetzt werden, wobei sich die Herstellung einer geeigneten Expressionskassette nach dem Organismus, in welchen das Gen exprimiert werden soll, richtet.

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform können die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen auch alleine in einen Organismus eingebracht werden.

Sollen neben den Nukleinsäuresequenzen weitere Gene in den Organismus eingeführt werden, so können alle zusammen in einem einzigen Vektor oder jedes einzelne Gen in je einem Vektor in den Organismus eingebracht werden, wobei die verschiedenen Vektoren gleichzeitig oder sukzessive eingebracht werden können.

Hierbei kann das Einbringen der erfindungsgemäßen Nukleinsäure(n), der Expressionskassette oder des Vektors in die entsprechenden Organismen (Transformation) prinzipiell nach allen dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen.

Für Mikroorganismen kann der Fachmann entsprechende Methoden den Lehrbüchern von Sambrook, J. et al. (1989) "Molecular cloning: A laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, von F.M. Ausubel et al. (1994) "Current protocols in molecular biology", John Wiley and Sons, von D.M. Glover et al., DNA Cloning Vol.1, (1995), IRL Press (ISBN 019-963476-9), von Kaiser et al. (1994) Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press oder Guthrie et al. "Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology", Methods in Enzymology, 1994, Academic Press entnehmen. Bei der Transformation von filamentösen Pilzen bieten sich zum einen die Herstellung von Protoplasten und Transformation mit Hilfe von PEG (Wiebe et al. (1997) Mycol. Res. 101 (7): 971-877; Proctor et al. (1997) Microbiol. 143, 2538-2591), zum anderen die Transformation unter zur Hilfe nahme von Agrobacterium tumefaciens (de Groot et al. (1998) Nat. Biotech. 16, 839-842) an.

24

Für dikotyle Pflanzen können die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt werden. Geeignete Methoden sind das biolistische Verfahren oder durch Protoplastentransformation (vergl. z.B. Willmitzer, L., 1993 Transgenic plants. In: Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise (H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, eds.), Vol. 2, 627-659, VCH Weinheim-New York-Basel-Cambridge), die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch Agrobacterium vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 sowie in Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec.Biol. 42 (1991) 205-225 beschrieben.

Die Transformation mittels Agrobakterien sowie die für die Transformation zu verwendenden Vektoren sind dem Fachmann bekannt und in der Literatur ausführlich beschrieben (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984) 8711. Die intermediären Vektoren können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige vir-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf Agrobacterium tumefaciens übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in E.coli als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarker-Gen und einen Linker oder Polylinker, welche von der rechten und linken T-DNA Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden (; Holsters et al. Mol. Gen. Genet. 163 (1978), 181-187), EP A 0 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam (1985), Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant. Sci., 4: 1-46 und An et al. EMBO J. 4 (1985), 277-287).

Auch die Transformation monokotyler Pflanzen mittels Agrobacterium basierender Vektoren wurde beschrieben (Chan et al, Plant Mol. Biol. 22(1993), 491-506; Hiei et al, Plant J. 6 (1994) 271-282; Deng et al; Science in China 33 (1990), 28-34; Wiltschko et al, Plant Cell Reports 11,(1992) 76-80; May et al; Biotechnology 13 (1995) 486-492; Conner und Domisse; Int. J. Plant Sci. 153 (1992) 550-555; Ritchie et al; Transgenic Res. (1993) 252-265). Alternative Systeme zur Transformation von monokotylen Pflanzen sind die Transformation mittels des biolistischen An-

25

satzes (Wan und Lemaux; Plant Physiol. 104 (1994), 37-48; Vasil et al; Biotechnology 11 (1992), 667-674; Ritala et al, Plant Mol. Biol 24, (1994) 317-325; Spencer et al, Theor. Appl. Genet. 79 (1990), 625-631) die Protoplastentransformation, die Elektro-
5 poration von partiell permeabilisierten Zellen ; die Einbringung von DNA mittels Glasfasern. Insbesondere die Transformation von Mais wurde in der Literatur mehrfach beschrieben (vgl. z.B. WO 95/06128; EP 0513849 A1; EP 0465875 A1; EP 0292435 A1; Fromm et al, Biotechnology 8 (1990), 833-844; Gordon-Kamm et al, Plant
10 Cell 2 (1990), 603-618; Koziel et al, Biotechnology 11 (1993) 194-200; Moroc et al, Theor Applied Genetics 80 (1990) 721-726).

Auch die erfolgreiche Transformation anderer Getreidearten wurde bereits beschrieben z.B. für Gerste (Wan und Lemaux, s.o.;
5 Ritala et al, s.o.; Weizen (Nehra et al, Plant J. 5 (1994) 285-297).

Mit einem erfindungsgemäßen Vektor transformierte Agrobakterien können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von
20 Pflanzen wie Testpflanzen wie Arabidopsis oder Kulturpflanzen wie Getreide, Mais, Hafer, Roggen, Gerste, Weizen, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Karotte, Paprika, Raps, Tapioka, Maniok, Pfeilwurz, Tagetes, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß-
25 und Weinspezies verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Die genetisch veränderten Pflanzenzellen können über alle dem Fachmann bekannten Methoden regeneriert werden. Entsprechende Methoden können den oben genannten Schriften von S.D. Kung und R. Wu, Potrykus oder Höfgen und Willmitzer entnommen werden.

Die durch Transformation mit einer der oben beschriebenen Ausführungsformen einer Expressionskassette, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder einem Vektor, enthaltend die
35 vorstehend genannte Expressionskassette, hergestellten transgenen Organismen sowie die mittels Expression aus dem transgenen Organismus erhältliche rekombinante SSP sind Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung
40 ist die Verwendung von transgenen Organismen enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionskassette z.B. für die Bereitstellung rekombinanten Proteins und/oder die Verwendung dieser Organismen in in vivo Testsystemen.

26

Bevorzugte Organismen für die rekombinante Expression sind neben Bakterien, Hefen, Moose, Algen, Pilze auch eukaryontische Zelllinien.

- 5 Bevorzugte Moose sind *Physcomitrella patens* oder weitere in Kryptogamen, Bd.2, Moose, Farne, 1991, Springer Verlag (ISBN 3540536515), beschriebene Moose.

- Innerhalb der Bakterien sind Bakterien der Gattung *Escherichia*,
10 *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* oder Cyanobakterien zum Beispiel der Gattung *Synechocystes*, *Anabaena*, *Calothrix*, *Scytonema*, *Oscillatoria*, *Plectonema* und *Nostoc*, besonders bevorzugt *Synechocystis* oder *Anabena* bevorzugt.

- 15 Bevorzugte Hefen sind *Candida*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula* oder *Pichia*.

- Bevorzugte Pilze sind *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Beauveria*, *Mortierella*, *Saprolegnia*, *Pythium*,
20 oder weitere in Indian Chem Engr. Section B. Vol 37, No 1,2 (1995) beschriebene Pilze.

- Bevorzugte Pflanzen sind insbesondere ausgewählt unter monokotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel Getreidearten wie Weizen,
25 Gerste, Hirse, Roggen, Triticale, Mais, Reis oder Hafer sowie dem Zuckerrohr. Ferner sind die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen insbesondere ausgewählt unter dikotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel Brassicaceae wie Raps, Kresse, *Arabidopsis*, Kohlarten oder Canola; Leguminosae wie Soja, Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen oder Erdnuss Solanaceae wie Kartoffel, Tabak, Tomate, Aubergine oder Paprika; Asteraceae wie Sonnenblume, Tagetes, Salat oder Calendula; Cucurbitaceae wie Melone, Kürbis oder Zucchini,
30 oder Lein, Baumwolle, Hanf, Flachs, Roter Pfeffer, Möhre, Karotte, Zuckerrübe oder verschiedene Baum-, Nuss- und Weinspecies.
35

Prinzipiell sind als Wirtsorganismen auch transgene Tiere geeignet wie beispielsweise *C. elegans*.

- Bevorzugt ist auch die Verwendung von Expressionssystemen und Vektoren,
40 die öffentlich zugänglich oder kommerziell erhältlich sind.

- Zur Verwendung in *E. coli* Bakterien sind die typischen vorteilhaften, kommerziell erhältlichen Fusions- und Expressionsvektoren pGEX [Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. and Johnson, K.S. (1988)
45 Gene 67:31-40], pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) and pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) welches Glutathion S-transferase beinhaltet (GST), Maltose Bindeprotein, oder Protein A, die pTrc-

Vektoren (Amann et al., (1988) Gene 69:301-315) der "pKK233-2" von CLONTECH, Palo Alto, CA und die "pET"-, und die "pBAD"-Vektor-Serien von Stratagene, La Jolla zu nennen.

- 5 Weitere vorteilhafte Vektoren zur Verwendung in Hefe sind pYep-Sec1 (Baldari, et al., (1987) Embo J. 6:229-234), pMFa (Kurjan and Herskowitz, (1982) Cell 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al., (1987) Gene 54:113-123), and pYES-Derivate, pGAPZ-Derivate, pPICZ-Derivate sowie die Vektoren des "Pichia Expression Kit" (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vektoren für die
- 10 Nutzung in filamentösen Pilzen sind beschrieben in: van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: Applied Molecular Genetics of Fungi, J.F. Peberdy, et al., eds., p. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge.

- Alternativ können auch vorteilhaft Insektenzellexpressionsvektoren genutzt werden z.B. für die Expression in Sf9, Sf21 oder Hi5 Zellen, welche über rekombinante Baculoviren infiziert werden.
- 20 Dies sind z.B. die Vektoren der pAc Serie (Smith et al. (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156-2165) und der pVL series (Lucklow and Summers (1989) Virology 170:31-39). Weiterhin genannt seien die Baculovirus Expressionssysteme "MaxBac 2.0 Kit" und "Insect Select System" von Invitrogen, Calsbad oder "BacPAK Baculovirus
- 25 Expressionssystem" von CLONTECH, Palo Alto, CA. Insektenzellen eignen sich in besonderer Weise zur Überexpression eukaryontischer Proteine, da sie posttranslationale Modifikationen der Proteine durchführen, die in Bakterien und Hefen nicht möglich sind. Die Handhabung von Insektenzellen in Zellkultur sowie ihre Infektion zur Expression von Proteinen sind dem Fachmann bekannt und können in Analogie zu bekannten Methoden erfolgen (Luckow und Summers, Bio/Tech. 6, 1988, pp.47-55; Glover and Hames (eds) in DNA Cloning 2, A practical Approach, Expression Systems, Second Edition, Oxford University Press, 1995, 205-244).

35

- Des weiteren können zur Genexpression vorteilhaft Pflanzenzellen oder Algenzellen genutzt werden. Beispiele für Pflanzenexpressionsvektoren finden sich wie obenstehend erwähnt in Becker, D., et al. (1992) "New plant binary vectors with selectable
- 40 markers located proximal to the left border", Plant Mol. Biol. 20: 1195-1197 oder in Bevan, M.W. (1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation", Nucl. Acid. Res. 12: 8711-8721.

- 45 Weiterhin können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen in Säugerzellen exprimiert werden. Beispiel für entsprechende Expressionsvektoren sind pCDM8 und pMT2PC genannt in: Seed, B.

(1987) Nature 329:840 oder Kaufman et al. (1987) EMBO J. 6:187-195). Dabei sind vorzugsweise zu nutzende Promotoren viralen Ursprungs wie z.B. Promotoren des Polyoma, Adenovirus 2, Cytomegalovirus oder Simian Virus 40. Weitere prokaryotische und eukaryotische Expressionssysteme sind genannt in Kapitel 16 und 17 in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989. Weitere vorteilhafte Vektoren werden in Hellens et al. (Trends in plant science, 5, 2000) beschrieben.

Sämtliche, oben beschriebenen Ausführungsformen der transgenen Organismen werden unter dem Begriff "erfindungsgemäßer transgener Organismus" zusammengefaßt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von SSP in einem Verfahren zur Identifizierung von Testverbindungen mit herbizider Wirkung.

Bevorzugt umfasst das erfindungsgemäße Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider Wirkung die folgenden Schritte:

i. Inkontaktbringen von SSP mit einer oder mehreren Testverbindungen unter Bedingungen, die die Bindung der Testverbindung(en) an die SSP erlauben; und

ii. Nachweis, ob die Testverbindung an die SSP aus i) bindet; oder

iii. Nachweis, ob die Testverbindung die Aktivität der SSP aus i) reduziert oder blockiert; oder

iv. Nachweis, ob die Testverbindung die Transkription, Translation oder Expression der SSP reduziert oder blockiert.

Der Nachweis gemäß Schritt (ii) des oben stehenden Verfahrens kann anhand von Techniken, welche die Wechselwirkung zwischen Protein und Ligand aufzeigen, erfolgen. Hierbei kann entweder die Testverbindung oder das Enzym eine detektierbare Markierung enthalten, wie z.B. eine fluoreszierende, radioisotope, chemilumineszierende oder enzymatische Markierung. Beispiele für enzymatische Markierungen sind Meerrettich Peroxidase, alkalische Phosphatase oder Luzififerase. Die anschließende Detektion richtet sich nach der Markierung und ist dem Fachmann bekannt.

Hierbei sind insbesondere fünf bevorzugte Ausführungsformen zu nennen, die im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung auch für Hochdurchsatzmethoden (High Throughput Screening, HTS) geeignet sind:

5

10

5

20

25

35

40

45

1. Über Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 11753-11575) läßt sich die durchschnittliche Diffusionsrate eines Fluoreszenzmoleküls in Abhängigkeit zur Masse in einem kleinen Probenvolumen bestimmen. Durch Messen der Massenänderung bzw. der daraus resultierenden veränderten Diffusionsrate einer Testverbindung beim Binden an die SSP läßt sich FCS zur Bestimmung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen einsetzen. Ein erfindungsgemäßes Verfahren kann direkt zur Messung der Bindung einer durch ein Fluoreszenzmolekül markierten Testverbindung aufgebaut werden. Alternativ kann das erfindungsgemäße Verfahren so konzipiert sein, dass eine durch ein Fluoreszenzmolekül markierte chemische Referenzverbindung durch weitere Testverbindungen verdrängt wird ("Verdrängungsassay"). Die so identifizierten Verbindungen können als Inhibitoren geeignet sein.
2. Die Fluoreszenzpolarisation nutzt die Eigenschaft eines mit polarisiertem Licht angeregten ruhenden Fluorophors ebenfalls wieder polarisiertes Licht zu emittieren. Kann der Fluorophor allerdings während des angeregten Zustands rotieren, so geht die Polarisation des emittierten Fluoreszenzlichts mehr oder weniger verloren. Bei sonst gleichen Bedingungen (z.B. Temperatur, Viskosität, Lösungsmittel) ist die Rotation eine Funktion der Molekülgröße, womit man über das Messsignal eine Aussage über die Größe des am Fluorophor gebundenen Rests treffen kann (Methods in Enzymology 246 (1995), pp. 283-300). Ein erfindungsgemäßes Verfahren kann direkt zur Messung der Bindung einer durch ein Fluoreszenzmolekül markierten Testverbindung an die SSP aufgebaut werden. Alternativ kann das erfindungsgemäße Verfahren auch in Form des unter 1 beschriebenen "Verdrängungsassays" konzipiert sein. Die so identifizierten Verbindungen können als Inhibitoren geeignet sein.
3. Fluoreszenz-Resonanz Energie Transfer" (FRET) basiert auf der strahlungslosen Energieübertragung zwischen zwei räumlich benachbarten Fluoreszenzmolekülen unter geeigneten Bedingungen. Eine Voraussetzung ist die Überlappung des Emissionsspektrums des Donormoleküls mit dem Anregungsspektrum des Akzeptormoleküls. Durch Fluoreszenzmarkierung der SSP und den auf Bindung Testverbindung kann mittels FRET die Bindung gemessen werden (Cytometry 34, 1998, pp. 159-179). Alternativ kann das erfindungsgemäße Verfahren auch in Form des unter 1 beschriebenen

"Verdrängungsassays" konzipiert sein. Eine besonders geeignete Ausführungsform der FRET Technologie ist die "Homogenous Time Resolved Fluorescence" (HTRF), wie sie von Packard BioScience vertrieben wird. Die so identifizierten Verbindungen können als Inhibitoren geeignet sein.

4. Surface Enhanced-Laser Desorption/Ionisation (SELDI) in Kombination mit einem "Time of Flight" Massenspektrometer (MALDI-TOF) ermöglicht die schnelle Analyse von Molekülen auf einem Träger und kann zur Analyse von Protein-Ligand Wechselwirkungen verwendet werden (Worral et al., (1998) Anal. Biochem. 70:750-756). In einer bevorzugten Ausführungsform immobilisiert man nun die SSP auf einem geeigneten Träger und inkubiert diesen mit der Testverbindung. Nach einem oder mehreren geeigneten Waschschritten kann man die an die SSP zusätzlich gebundenen Moleküle der Testverbindung mittels der oben erwähnten Methodik detektieren und somit an die SSP gebundene Testverbindungen selektieren. Die so identifizierten Verbindungen können als Inhibitoren geeignet sein.

5. Die Messung von Oberflächen Plasmonenresonanz basiert auf der Änderung des Brechungsindex an einer Oberfläche beim Binden einer Testverbindung an ein auf besagter Oberfläche immobilisiertes Protein. Da die Änderung des Brechungsindex für eine definierte Änderung der Massenkonzentration an der Oberfläche quasi für alle Proteine und Polypeptide identisch ist, kann diese Methode prinzipiell auf jedes Protein angewendet werden (Lindberg et al. Sensor Actuators 4 (1983) 299-304; Malmquist Nature 361 (1993) 186-187). Die Messung kann beispielsweise mit Hilfe der von Biacore (Freiburg) vertriebenen auf Oberflächen-Plasmonenresonanz basierenden Analyseautomaten in einem Durchsatz von derzeit bis zu 384 Proben pro Tag durchgeführt werden. Ein erfindungsgemäßes Verfahren kann direkt zur Messung der Bindung einer Testverbindung an die SSP aufgebaut werden. Alternativ kann das erfindungsgemäße Verfahren auch in Form des unter 1 beschriebenen "Verdrängungsassays" konzipiert sein. Die so identifizierten Verbindungen können als Inhibitoren geeignet sein.

Sämtliche, über die oben genannten Verfahren identifizierten Substanzen können anschließend in einer anderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens auf ihre herbizide Wirkung überprüft werden.

Auch besteht die Möglichkeit, über Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der SSP mittels Röntgenstrukturanalyse weitere potentielle herbizide Wirkstoffe mittels "Molecular Modelling" zu

detektieren. Die Herstellung von für die Röntgenstrukturanalyse benötigten Proteinkristallen sowie die entsprechenden Messungen und anschließenden Auswertungen dieser Messungen, die Detektion einer Bindungsstelle im Protein sowie die Vorhersage möglicher Inhibitorstrukturen sind dem Fachmann bekannt. Über "Molecular Modelling" ist prinzipiell auch eine Optimierung der über die oben genannten Verfahren identifizierten Verbindungen möglich.

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, das auf den Schritten i) und ii) basiert, besteht darin, daß

- i. eine SSP in einem erfindungsgemäßen, transgenen Organismus exprimiert wird oder ein Organismus, der naturgemäß eine SSP enthält, kultiviert wird;
- ii. die SSP aus Schritt i) im Zellaufschluss des transgenen bzw. nicht transgenen Organismus, in partiell gereinigter Form oder in zur Homogenität gereinigten Form mit einer Testverbindung in Kontakt gebracht wird; und
- iii. eine Verbindung selektiert wird, welche die Aktivität der SSP reduziert oder blockiert, wobei die Aktivität der mit der Testverbindung inkubierten SSP mit der Aktivität einer nicht mit einer Testverbindung inkubierten SSP ermittelt wird.

Die SSP enthaltende Lösung kann aus dem Lysat des ursprünglichen Organismus oder des transgenen, mit einer erfindungsgemäßen Expressionskassette transformierten Organismus bestehen. Falls erforderlich kann die SSP partiell oder vollständig über gängige Methoden aufgereinigt werden. Eine allgemeine Übersicht über gängige Techniken zur Reinigung von Proteinen sind beispielsweise in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1994); ISBN 0-87969-309-6 beschrieben. Bei rekombinanter Darstellung kann eine Reinigung des mit einem Affinitäts-Tag fusionierten Proteins über nach dem Fachmann bekannten Affinitätschromatographie erfolgen.

Die für in vitro Verfahren benötigte SSP kann somit entweder mittels heterologer Expression aus einem erfindungsgemäßen, transgenen Organismus oder aus einem Organismus, der eine SSP Aktivität enthält, isoliert werden, vorzugsweise aus einer unerwünschten Pflanze, wobei unter dem Begriff der unerwünschten Pflanze die eingangs erwähnten Spezies zu verstehen sind.

Zur Identifizierung von herbiziden Verbindungen wird nun die SSP mit einer Testverbindung inkubiert. Nach einer Reaktionszeit wird die Aktivität der mit der Testverbindung inkubierten SSP mit der Aktivität einer nicht mit einer Testverbindung inkubierten SSP ermittelt. Bei Inhibition der SSP beobachtet man eine signifikante Abnahme der Aktivität im Vergleich zur Aktivität des nicht inhibierten erfindungsgemäßen Polypeptides, wobei eine Abnahme von mindestens 10%, vorteilhaft mindestens 20%, bevorzugt mindestens 30%, besonders bevorzugt um mindestens 50% bis hin zu einer 100% Reduktion (Blockierung) erzielt wird. Bevorzugt mindestens 50% Hemmung bei Konzentrationen der Testverbindung von 10^{-4} M, bevorzugt bei 10^{-5} M, besonders bevorzugt von 10^{-6} M bezogen auf Enzymkonzentration im mikromolaren Bereich.

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der SSP kann beispielsweise über einen Aktivitätstest erfolgen, in welchem die Zunahme des Produktes, die Abnahme des Substrates (oder Eduktes) oder über eine Kombination aus mindestens zwei der vorstehend genannten Parameter in Abhängigkeit einer definierten Zeitspanne bestimmt werden.

Beispiele für geeignete Substrate sind z.B. Saccharose-6-phosphat oder Nitrophenylverbindungen wie z.B. p-Nitrophenylphosphat, vorzugsweise Saccharose-6-phosphat, und für geeignete Cofaktoren zweiwertige Metalle wie Magnesium oder Mangan, vorzugsweise Magnesium. Gegebenenfalls können auch Derivate der vorstehend genannten Verbindungen verwendet werden, die eine detektierbare Markierung enthalten, wie z.B. eine fluoreszierende, radioisotope oder chemilumineszierende Markierung.

Die für den Aktivitätstest einzusetzenden Mengen an Substrat können zwischen 0.5-10 mM und Mengen an Cofaktor zwischen 0.1-5 mM bezogen auf 1-100 µg/ml Enzym liegen.

Die Bestimmung der Aktivität kann beispielsweise in Analogie zu dem von Echeverria und Salerno (1994; Plant Sci 96, 15) beschriebenen Verfahren oder nach dem von Whitaker (1984) Phytochemistry 23, 2429) beschriebenen Verfahren erfolgen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird der Umsatz eines Substrates über Quantifizierung des bei der Reaktion entstandenen Phosphates mittels Ascorbat-Ammoniummolybdat-Reagenzes (Ames (1966), Methods Enzymol. 8, 115) erfolgen angelehnt an ein von Lunn et al. (2000, Procl. Natl. Acad. Sci. USA 97: 12914) beschreibendes Verfahren. Es können jedoch auch Abwandlungen der von Ames beschriebenen Methode zur Phosphatdetektion verwendet werden z.B. das von Chifflet et al. (1988) Analytical Biochemistry

168: 1) beschriebene Verfahren, welche sich besonders für labile organische Phosphate und in Anwesenheit hoher Proteinkonzentrationen eignet, das von Lanzetta et al. (1979, Analytical Biochemistry 100: 95) beschriebene Verfahren, welches eine Methode zum Nachweis von Phosphat im Nanomol-Bereich umfasst, bei der der entstehende Farbkomplex besonders stabilisiert wird. Ebenfalls verwendet werden zur Detektion können kommerziell erhältliche Kits z.B. von Merck (Posphat-Test (PMB) AM Katalognummer 1.11139.0001)).

10

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann die Bestimmung der Aktivität der aus Saccharose-6-P freigesetzte Saccharose bestimmt werden. Hierzu kommen z.B. optisch-Enzymatische Verfahren in betracht wie z.B. beschrieben bei Sonnewald (1992, Plant Journal 2: 571) oder chromatographische Methoden mittels HPLC (Börnke et al. 2001, J Bacteriol 183: 2425). Der Fachmann kann darüber hinaus auch Verfahren zum chemischen Nachweis der entstandenen Saccharose der Literatur entnehmen.

20 Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, das auf den Schritten i) und iii) basiert, besteht aus den folgenden Schritten:

i. Herstellung eines erfindungsgemäßen transgenen Organismus;

25

ii. Aufbringen einer Testverbindung auf den transgenen Organismus nach i) und auf einen nicht-transgenen Organismus des gleichen Genotyps;

iii. Bestimmen des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit des transgenen und des nicht transgenen Organismus nach der Aufbringung der Testverbindung; und

35

iv. Selektion von Testverbindungen, die ein vermindertes Wachstum oder eingeschränkte Überlebensfähigkeit des nicht-transgenen Organismus bewirken verglichen mit dem Wachstum des transgenen Organismus bewirken.

Hierbei beträgt der Wachstumsunterschied der in Schritt iv) zur Selektion eines Inhibitors mit herbizider Wirkung mindestens 10%, vorzugsweise 20%, bevorzugt 30%, besonders bevorzugt 40% und ganz besonders bevorzugt 50%.

Der transgene Organismus ist hierbei eine Pflanze, Alge, ein Cyanobakterien z.B. der Gattung Synechocystes, Anabaena, Calothrix, Scytonema, Oscillatoria, Plectonema und Nostoc, oder ein Proteobakterium wie etwa Magnetococcus sp. MC1, bevorzugt Pflanzen, die

34

sich mittels gängiger Techniken leicht transformieren lassen, wie Arabidopsis thaliana, Solanum tuberosum, Nicotiana Tabacum, Cyanobakterien die sich leicht transformieren lassen, wie z.B. Synechocystis, in welchen die für ein erfindungsgemäße Polypeptid kodierende Sequenz über Transformation inkorporiert wurde. Diese transgenen Organismen weisen daher eine erhöhte Toleranz gegen Verbindungen auf, welche das erfindungsgemäße Polypeptid inhibieren. Hierbei können auch "knock-out"-Mutanten verwendet werden können bei denen das in diesem Organismus vorhandene analoge SSP-Gen gezielt ausgeschaltet worden ist.

Die vorstehend genannte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens kann jedoch auch zur Identifizierung von Substanzen mit wachstumsregulatorischer Wirkung verwendet werden. Hierbei wird als transgener Organismus eine Pflanze eingesetzt. Das Verfahren zur Identifizierung von Substanzen mit wachstumsregulatorischer Wirkung umfasst somit die folgenden Schritte:

- i. Herstellung einer transgenen Pflanze enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz;
- ii. Aufbringen einer Testsubstanz auf die transgene Pflanze nach i) und auf eine nicht-transgene Pflanze der gleichen Sorte;
- iii. Bestimmen des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit der transgenen und der nicht transgenen Pflanze nach dem Aufbringen der Testsubstanz; und
- iv. Selektion von Testsubstanzen, die ein verändertes Wachstum der nicht-transgenen Pflanze bewirken verglichen mit dem Wachstum der transgenen Pflanze.

Hierbei werden in Schritt iv) Testverbindungen selektiert, die ein verändertes Wachstum des nicht-transgenen Organismus bewirken verglichen mit dem Wachstum des transgenen Organismus bewirken. Unter verändertem Wachstum ist hierbei eine Hemmung des vegetativen Wachstums der Pflanzen zu verstehen, was sich insbesondere in einer Reduzierung des Längenwachstums äußern kann. Die behandelten Pflanzen weisen demgemäß einen gedrungenen Wuchs auf; außerdem ist eine dunklere Blattfärbung zu beobachten. Weiterhin ist unter verändertem Wachstum auch eine zeitliche Veränderung des Reifeverlaufs, eine Hemmung oder Vermehrungen seitlicher Verzweigungen der Pflanzen, eine Verkürzung bzw. Verlängerung der Entwicklungsstadien, eine Erhöhung der Standfestigkeit, das Wachstum größerer Mengen an Knospen, Blüten, Blättern, Früchten, Samenkörnern, Wurzeln und Knollen, eine Erhöhung des Zuckergehaltes in Pflanzen wie Zuckerrüben, Zuckerrohr sowie Zitrusfrüchten,

35

des Proteingehaltes in Pflanzen wie Getreide oder Soja oder eine Stimulierung des Latexfluß an Gummibäumen zu verstehen. Die Detektion dieses veränderten Wachstums ist dem Fachmann bekannt.

5 Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren können auch mehrere Testverbindungen in einem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden. Wenn durch eine Gruppe von Testverbindungen eine Beeinflussung des Targets erfolgt, dann ist es entweder möglich, die einzelnen Testverbindungen direkt zu isolieren oder die Gruppe von Testver-
10 bindungen in verschiedene Untergruppen zu teilen, z.B. wenn sie aus einer Vielzahl von verschiedenen Komponenten besteht, um so die Zahl der verschiedenen Testverbindungen im erfindungsgemäßen Verfahren zu reduzieren. Das erfindungsgemäße Verfahren wiederholt man dann mit der einzelnen Testverbindung oder der entsprechenden Untergruppe von Testverbindungen. Abhängig von der Komplexität der Probe können die oben beschriebenen Schritte mehrmals wiederholt werden, vorzugsweise bis die gemäß der erfindungsgemäßen Methode identifizierte Untergruppe nur noch eine geringe Anzahl von Testverbindungen oder nur noch eine Testverbin-
20 dung umfaßt.

Alle oben beschriebenen Verfahren für die Identifizierung von Inhibitoren mit herbizider Wirkung werden im folgenden als "erfindungsgemäße Verfahren" bezeichnet.

25

Sämtliche, über die erfindungsgemäßen Verfahren identifizierten Verbindungen können anschließend auf ihre herbizide Wirkung in vivo überprüft werden. Eine Möglichkeit zur Prüfung der Verbindungen auf herbizide Wirkung ist die Verwendung der Wasserlinse Lemna minor in Mikrotiterplatten. Als Parameter können Veränderungen des Chlorophyllgehalts und die Photosyntheseleistung gemessen werden. Es ist auch möglich, die Verbindung auf unerwünschte Pflanzen direkt zu applizieren, wobei die herbizide Wirkung z.B. über eingeschränktes Wachstum festgestellt werden kann.

35

Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch vorteilhaft in Hochdurchsatzverfahren, sog. HTS durchgeführt werden, welches das parallele Testen einer Vielzahl verschiedener Verbindungen ermöglicht.

40

Im HTS bietet sich für die praktische Durchführung die Verwendung von Trägern an, die eines oder mehrere der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle, einen oder mehrere die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz enthaltenden Vektoren, einen oder mehrere
45 transgene Organismen, welche mindestens eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen enthalten oder eines oder mehrere (Poly)peptide codiert über die erfindungsgemäßen Nukleinsäurese-

quenzen enthalten. Der verwendete Träger kann fest oder flüssig sein, ist bevorzugt fest, besonders bevorzugt eine Mikrotiterplatte. Die vorstehend genannten Träger sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Gemäß der am weit verbreitesten Technik werden 96-well, 384-well und 1536 well Mikrotiterplatten verwendet, die in der Regel Volumina von 200 µl umfassen können. Neben den Mikrotiterplatten sind die weiteren Bestandteile eines HTS-Systems passend zu den entsprechenden Mikrotiterplatten wie viele Instrumente, Materialien, automatische Pipettiervorrichtungen, Robotoren, automatisierte Plattenleser sowie Plattenwascher kommerziell erhältlich.

Neben den auf Mikrotiterplatten basierenden HTS-Verfahren können auch sogenannte "free format assays" oder Testsysteme, die zwischen den Proben keine physischen Barrieren aufweisen, verwendet werden wie z.B. in Jayaickreme et al., Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 19 (1994) 161418; Chelsky, "Strategies for Screening Combinatorial Libraries, First Annual Conference of The Society for Biomolecular Screening in Philadelphia, Pa. (Nov. 710, 1995); Salmon et al., Molecular Diversity 2 (1996), 5763 und US 5,976,813.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Verbindungen mit herbizider Wirkung identifiziert nach den erfindungsgemäßen Verfahren. Diese Verbindungen werden im folgenden "selektierte Verbindungen" genannt. Sie weisen ein Molekulargewicht von kleiner als 1000 g/mol, vorteilhaft kleiner 500 g/mol, bevorzugt kleiner 400 g/mol, besonders bevorzugt kleiner 300 g/mol. Verbindungen mit herbizider Wirkung weisen einem Ki-Wert kleiner 1 mM, bevorzugt kleiner 1 µM, besonders bevorzugt kleiner 0,1 µM ganz besonders bevorzugt kleiner 0,01 µM aufweisen.

Die selektierte Verbindungen können natürlich auch in Form ihrer landwirtschaftlich brauchbaren Salze vorliegen. Unter landwirtschaftlich brauchbaren Salzen kommen vor allem die Salze derjenigen Kationen oder die Säureadditionssalze derjenigen Säuren in Betracht, deren Kationen beziehungsweise Anionen die herbizide Wirkung der über die erfindungsgemäßen Verfahren identifizierten Verbindungen mit herbizider Wirkung nicht negativ beeinträchtigen.

Ferner können die selektierte Verbindungen sofern sie asymmetrisch substituierte α -Kohlenstoffatome enthalten, entweder als Racemate, Enantiomerengemische, reine Enantiomere oder, sofern sie chirale Substituenten aufweisen, auch als Diastereomerengemische vorliegen.

37

Die selektierten Verbindungen können chemisch synthetisierte oder mikrobiologisch produzierte Stoffe sein und z.B. in Zellextrakten von z.B. Pflanzen, Tieren oder Mikroorganismen auftreten. Das Reaktionsgemisch kann ein zellfreier Extrakt sein oder eine Zelle
5 oder Zellkultur umfassen. Geeignete Methoden sind dem Fachmann bekannt und werden z.B. allgemein beschrieben in Alberts, Molecular Biology the cell, 3rd Edition (1994), z.B. Kapitel 17. Die selektierte Verbindungen können auch aus umfangreichen Substanzbibliotheken stammen.

10

Mögliche Testverbindungen können Expressionsbibliotheken wie z.B. cDNA-Expressionsbibliotheken, Peptide, Proteine, Nukleinsäuren, Antikörper, kleine organische Stoffe, Hormone, PNAs oder ähnliches sein (Milner, Nature Medicine 1 (1995), 879-880; Hupp, Cell. 83 (1995), 237-245; Gibbs, Cell. 79 (1994), 193-198 und darin zitierte Referenzen).

20

Die selektierte Verbindungen können zur Bekämpfung von unerwünschtem Pflanzenwuchs, unter Umständen auch zur Defoliation, beispielsweise von Kartoffeln, oder Desikkation, beispielsweise von Baumwolle, sowie als Wachstumsregulatoren verwendet werden. Herbizide Zusammensetzungen, welche die selektierten Verbindungen enthalten, bekämpfen Pflanzenwuchs auf Nichtkulturflächen sehr gut. In Kulturen wie Weizen, Reis, Mais, Soja und Baumwolle wirken sie gegen Unkräuter und Schadgräser, ohne die Kulturpflanzen
25 nennenswert zu schädigen. Dieser Effekt tritt vor allem bei niedrigen Aufwandsmengen auf. Die selektierten Verbindungen können zur Bekämpfung der oben bereits erwähnten Schadpflanzen verwendet werden.

25

In Abhängigkeit von der jeweiligen Applikationsmethode können selektierten Verbindungen bzw. diese enthaltende herbizide Zusammensetzungen vorteilhaft noch in einer weiteren Zahl von Kulturpflanzen zur Beseitigung unerwünschter Pflanzen eingesetzt werden.
35 In Betracht kommen beispielsweise folgende Kulturen:

40

Allium cepa, Ananas comosus, Arachis hypogaea, Asparagus officinalis, Beta vulgaris spec. altissima, Beta vulgaris spec. rapa, Brassica napus var. napus, Brassica napus var. napobrassica, Brassica rapa var. silvestris, Camellia sinensis, Carthamus tinctorius, Carya illinoensis, Citrus limon, Citrus sinensis, Coffea arabica (Coffea canephora, Coffea liberica), Cucumis sativus, Cynodon dactylon, Daucus carota, Elaeis guineensis, Fragaria vesca, Glycine max, Gossypium hirsutum,
45 (Gossypium arboreum, Gossypium herbaceum, Gossypium vitifolium), Helianthus annuus, Hevea brasiliensis, Hordeum vulgare, Humulus lupulus, Ipomoea batatas, Juglans regia, Lens culinaris, Linum

38

usitatissimum, Lycopersicon lycopersicum, Malus spec., Manihot esculenta, Medicago sativa, Musa spec., Nicotiana tabacum (N.rustica), Olea europaea, Oryza sativa, Phaseolus lunatus, Phaseolus vulgaris, Picea abies, Pinus spec., Pisum sativum, 5 Prunus avium, Prunus persica, Pyrus communis, Ribes sylestre, Ricinus communis, Saccharum officinarum, Secale cereale, Solanum tuberosum, Sorghum bicolor (s. vulgare), Theobroma cacao, Tri-folium pratense, Triticum aestivum, Triticum durum, Vicia faba, Vitis vinifera, Zea mays.

10

Darüber hinaus können die selektierten Verbindungen auch in Kul-turen, die durch Züchtung einschließlich gentechnischer Methoden gegen die Wirkung von Herbiziden tolerant sind, verwandt werden. Die Herstellung dieser Kulturen wird weiter unten beschrieben.

15

Weiter Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung der oben bereits erwähnten herbiziden Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet dass man selektierten Verbindungen mit geeigneten Hilfsmitteln zu Pflanzenschutzmitteln formuliert.

20

Die selektierten Verbindungen können z.B. in Form von direkt ver-sprühbaren wässrigen Lösungen, Pulvern, Suspensionen, auch hoch-prozentigen wässrigen, öligen oder sonstigen Suspensionen bzw. Suspoemulsionen oder Dispersionen, emulgierbaren Konzentraten,

25

Emulsionen, Öldispersionen, Pasten, Stäubemitteln, Streumitteln oder Granulaten formuliert werden und durch Versprühen, Verne-beln, Verstäuben, Verstreuen oder Gießen angewendet werden. Die Anwendungsformen richten sich nach den Verwendungszwecken und der Natur der selektierten Verbindungen und sollte in jedem Fall mög-

30

lichst die feinste Verteilung der selektierten Verbindungen ge-währleisten. Die herbiziden Zusammensetzung enthalten eine herbi-zid wirksame Menge mindestens einer selektierten Verbindung und für die Formulierung von herbiziden Zusammensetzungen übliche Hilfsstoffe.

35

Zur Herstellung von Emulsionen, Pasten oder wässrigen oder ölhal-tigen Formulierungen sowie dispergierbaren Konzentraten (DC) kön-nen die selektierten Verbindungen in einem Öl oder Lösungsmittel gelöst oder dispergiert werden, wobei weitere Formulierungshilfs-

40

stoffe zur Homogenisierung zugesetzt werden können. Es können aber auch aus selektierter Verbindung, gegebenenfalls Lösungsmit-teln oder Öl sowie optional weiteren Hilfsmitteln bestehende flüssige oder feste Konzentrate hergestellt werden, die zur Ver-dünnung mit Wasser geeignet sind. Hier zu nennen sind emulgier-bare Konzentrate (EC, EW), Suspensionen (SC), lösliche Konzen-trate (SL), dispergierbaren Konzentrate (DC), Pasten, Pastillen netzbaren Pulvern oder Granulaten, wobei die festen Formulierung-

45

gen entweder in Wasser löslich (soluble) oder dispergierbar (wettable) sein können. Desweiteren können entsprechende Pulver bzw. Granulate oder Tabletten noch mit einem festen, den Abrieb oder eine vorzeitige Wirkstofffreisetzung verhindernden Überzug
5 ("coating") versehen werden.

Prinzipiell sind unter dem Begriff "Hilfsmittel" folgende Verbindungsklassen zu verstehen: Antischäumungsmittel, Verdicker, Netzmittel, Haftmittel, Dispergiermittel, Emulgiermittel, Bakterizide
10 und/oder thixotrophe Agentien. Die Bedeutung der oben genannten Mittel ist dem Fachmann bekannt.

SLs, EWs und ECs können durch einfaches Mischen der entsprechenden Inhaltsstoffe hergestellt werden, Pulver über Mischen oder
5 Vermahlen in speziellen Mühlentypen (z.Bsp. Hammermühlen). DC, SCs und SEs werden üblicherweise über Naßvermahlung ("wet milling") hergestellt, wobei ein SE aus einem SC durch Zugabe einer organischen Phase, die weitere Hilfsmittel oder selektierte Verbindungen enthalten kann, hergestellt werden kann. Die Herstellung
20 lung ist bekannt. Pulver-, Streu- und Stäubemittel können vorteilhaft durch Mischen oder gemeinsames Vermahlen der wirksamen Substanzen mit einem festen Trägerstoff hergestellt werden. Granulate, z.B. Umhüllungs-, Imprägnierungs- und Homogengranulate können durch Bindung der selektierten Verbindungen an feste Trägerstoffe hergestellt werden. Weitere Details der Herstellung
25 sind dem Fachmann bekannt, und z.Bsp. in folgenden Schriften aufgeführt: US 3,060,084, EP-A 707445 (für flüssige Konzentrate), Browning, "Agglomeration", Chemical Engineering, Dec. 4, 1967, 147-48, Perry's Chemical Engineer's Handbook, 4th Ed., McGraw-Hill, New York, 1963, pages 8-57 und ff. WO 91/13546, US 4,172,714, US 4,144,050, US 3,920,442, US 5,180,587, US 5,232,701, US 5,208,030, GB 2,095,558, US 3,299,566, Klingman, Weed Control as a Science, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1961, Hance et al., Weed Control Handbook, 8th Ed., Blackwell
35 Scientific Publications, Oxford, 1989 und Mollet, H., Grubemann, A., Formulation technology, Wiley VCH Verlag GmbH, Weinheim (Federal Republic of Germany), 2001.

Inerte flüssige und/oder feste Trägerstoffe geeignet für die erfindungsgemäßen Formulierungen sind dem Fachman in einer Vielzahl
40 bekannt, wie z.Bsp. flüssige Zusatzstoffe wie Mineralölfraktionen von mittlerem bis hohem Siedepunkt, wie Kerosin oder Dieselöl, ferner Kohlenteeröle sowie Öle pflanzlichen oder tierischen Ursprungs, aliphatische, cyclische und aromatische Kohlenwasserstoffe, z.B. Paraffin, Tetrahydronaphthalin, alkylierte Naphthaline oder deren Derivate, alkylierte Benzole oder deren Derivate,
45 Alkohole wie Methanol, Ethanol, Propanol, Butanol, Cyclohexanol,

40

Ketone wie Cyclohexanon oder stark polare Lösungsmittel, z.B. Amine wie N-Methylpyrrolidon oder Wasser.

Feste Trägerstoffe sind beispielsweise Mineralerden wie Kieselsäuren, Kieselgele, Silikate, Talkum, Kaolin, Kalkstein, Kalk, Kreide, Bolus, Löß, Ton, Dolomit, Diatomeenerde, Calcium- und Magnesiumsulfat, Magnesiumoxid, gemahlene Kunststoffe, Düngemittel, wie Ammoniumsulfat, Ammoniumphosphat, Ammoniumnitrat, Harnstoffe und pflanzliche Produkte wie Getreidemehl, Baumrinden-, Holz- und Nußschalenmehl, Cellulosepulver oder andere feste Trägerstoffe.

Oberflächenaktive Stoffe (Tenside) geeignet für die erfindungsgemäßen Formulierungen sind dem Fachman in einer Vielzahl bekannt, wie z.Bsp. Alkali-, Erdalkali-, Ammoniumsalze von aromatischen Sulfonsäuren, z.B. Lignin-, Phenol-, Naphthalin- und Dibutyl-naphthalinsulfonsäure, sowie von Fettsäuren, Alkyl- und Alkylarylsulfonaten, Alkyl-, Laurylether- und Fettalkoholsulfaten, sowie Salze sulfatierter Hexa-, Hepta- und Octadecanolen sowie von Fettalkoholglykoether, Kondensationsprodukte von sulfoniertem Naphthalin und seiner Derivate mit Formaldehyd, Kondensationsprodukte des Naphthalins bzw. der Naphthalinsulfonsäuren mit Phenol und Formaldehyd, Polyoxyethylenoctylphenolether, ethoxyliertes Isooctyl-, Octyl- oder Nonylphenol, Alkylphenyl-, Tributylphenylpolyglykoether, Alkylarylpolyetheralkohole, Isotridecylalkohol, Fettalkoholethylenoxid-Kondensate, ethoxyliertes Rizinusöl, Polyoxyethylenalkylether oder Polyoxypropylenalkylether, Laurylalkoholpolyglykoetheracetat, Sorbitester, Lignin-Sulfitablaugen oder Methylcellulose.

Die Applikation der herbiziden Zusammensetzungen bzw. der selektierten Verbindungen kann im Vorauf- oder im Nachaufverfahren erfolgen. Sind die selektierten Verbindungen für gewisse Kulturpflanzen weniger verträglich, so können Ausbringungstechniken angewandt werden, bei welchen die selektierten Verbindungen mit Hilfe der Spritzgeräte so gespritzt werden, daß die Blätter der empfindlichen Kulturpflanzen nach Möglichkeit nicht getroffen werden, während die selektierten Verbindungen auf die Blätter darunter wachsender unerwünschter Pflanzen oder die unbedeckte Bodenfläche gelangen (post-directed, lay-by).

40

Die Aufwandmengen an selektierten Verbindungen betragen je nach Bekämpfungsziel, Jahreszeit, Zielpflanzen und Wachstumsstadium 0.001 bis 3.0, vorzugsweise 0.01 bis 1.0 kg/ha.

45

Die Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele weiter veranschaulicht, die nicht als beschränkend aufgefaßt werden sollten.

5 Allgemeine DNA-Manipulations- und Klonierungsverfahren

Klonierungsverfahren wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylon Membranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *Escherichia coli* Zellen, Anzucht von Bakterien und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) und Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1994); ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeführt.

Pflanzenmolekularbiologische Standardverfahren sowie Pflanzen-transmutationsverfahren sind beschrieben in Schultz et al., Plant Molecular Biology Manual, Kluwer Academic Publishers (1998), Reither et al., Methods in Arabidopsis Research, World Scientific Press (1992) und Arabidopsis: A Laboratory Manual (2001), ISBN 0-87969-573-0.

Die im folgenden verwendeten Bakterienstämme (*E. coli* DH5 α , XL-1 blue, BL21DE(3), JM 109) wurden von Stratagene, BRL Gibco oder Invitrogen, Carlsberg, CA bezogen. Zur Klonierung wurden die Vektoren pCR-Blunt (Invitrogen) und pUC 18 der Firma Amersham Pharmacia (Freiburg), pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66, 1990, 221-230), pCR und pQE-9 (Qiagen, Hilden) verwendet.

Beispiel 1 - Klonierung von SPP kodierenden Sequenzen aus *Solanaceae*

Zur Ableitung von für SPP kodierende DNA Sequenzen wurde mit Hilfe des BLAST Algorithmus (Altschul et al. 1990, J. Mol. Biol. 215, pp. 403-410) und der Proteinsequenz der SPP1 aus *Arabidopsis thaliana* (Acc. Nr. AF283565) die 6-Frame Translation der EST Datenbank (Genbank) durchmustert. Dabei wurden mehrere signifikante Treffer, unter anderem aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*) und Kartoffel (*Solanum tuberosum*), identifiziert. Die Hits der ersten Runde wurden für weitere Datenbanksuchen nach obigem Modus eingesetzt bis der gesamte kodierende Bereich einer potentiellen SPP durch überlappende Tomaten bzw. Kartoffel ESTs abgedeckt wurde. Von der so erhaltenen Sequenzinformation wurden die Primer

FB 224 5'-CTA AAA GAA CCA GGA CGC GGA GTC ACT-3'

abgeleitet, welche den gesamten kodierenden Bereich flankieren.

Diese Primer wurden in einer Standard-PCR-Reaktion z.B. nach T.

5 Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) eingesetzt um SPP kodierende Sequenzen aus cDNA-Banken aus Tabak und Kartoffel (hergestellt nach Standardmethoden über den lambda-ZAP-Kit von Stratagene) zu isolieren. Dabei konnten zwei unterschiedliche Klone aus der Tabak cDNA Bank (SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3) und ein Klon aus der cDNA-Bank aus Kartoffel (SEQ ID NO:5) isoliert werden. Der Kartoffelklon wurde durch RACE PCR komplettiert (hergestellt nach Standardmethoden über den Clontech "Smart™ RACE cDNA Amplification Kit").

15 Beispiel 2 - Erzeugung des Plasmids pBinNtSPP-RNAi

Die *in vivo*-Bedeutung der SPP-Aktivität wurde durch gezielte Suppression der SPP Genexpression in transgenen Pflanzen analysiert.

20 Zur Erstellung eines hierfür geeigneten Konstruktes basierend auf der SEQ ID NO:1 wurde zunächst das erste Intron der GA20-Oxidase aus *Solanum tuberosum* (StGA20oxIN, SEQ ID NO:7) unter Verwendung der Primer

25 GAIN-1 5'-CCT GCA GGC TCG AGA CTA GTA GAT CTG GTA CGG ACC GTA CTA CTC TA-3' und

GAIN-2 (5'-CCT GCA GGG TCG ACT CTA GAG GAT CCC CTA TAT AAT TTA AGT GGA AAA-3')

30 über PCR nach Standardbedingungen (z.B. nach T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)) amplifiziert, so dass am 5'Ende die Schnittstellen PstI/

35 SbfI-XhoI-SpeI-BglII sowie am 3'Ende die Schnittstellen BamHI-XbaI-SalI-PstI/SbfI angefügt wurden. Das erhaltene PCR-Fragment wurde in einen pCR-Blunt Vektor subkloniert (pCR-Blunt-GA20) und nach einem StuI-Verdau „Blunt-end“ des pCR-Blunt-GA20 in einen pUC18 Vektor ligiert, der vorher durch einen EcoRI/HindIII-Verdau
40 geöffnet und durch PFU-Polymerase gemäß Herstellerangaben? aufgefüllt wurde. Der so erhaltene Vektor pUC-RNAi wurde als Template in einer PCR nach Standardbedingungen (z.B. nach T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
45 (1989)) unter Verwendung der Primer

43

FB228 5'-GGA TCC ATG GAT CAG CTA ACC AGT GCC -3' und

FB229 5-GTC GAC TAC CAT TAC ACC ATA ACA CAT C -3'

- 5 eingesetzt, wobei ein mit endständigen BamHI/SalI Restriktions-schnittstellen versehenes 660 bp Fragment der SEQ ID NO:1 (bp 1-660) amplifiziert wurde. Das amplifizierte Fragment (NtSSP2) wurde zunächst in antisense-Orientierung (a) in den BglII/XhoI geöffneten pUC-RNAi kloniert (ergibt Vektor pUC-RNAi-aNtSSP2).
- 10 Anschließend wurde das gleiche Fragment über BamHI/SalI in sense Orientierung in den Vektor pUC-RNAi-aNtSSP2 kloniert (ergibt Vektor pUC-RNAi-aNtSSP2-StGA20oxIN-sNtSSP2).. Die hierbei entstandene Kassette wurde über PstI aus dem Vektor pUC-RNAi-aNtSSP2-StGA20oxIN-sNtSSP2 in einen SbfI geschnittenen BinAR ligiert, wodurch das Plasmid pBinNtSPP-RNAi erhalten wurde.

Beispiel 3 - Transformation und Analyse von Tabakpflanzen

- 20 Das Konstrukt pBinNtSPP-RNAi wurde nach Deblaere et al. (Nucl. Acids. Res. 13(1984), 4777-4788) in den Agrobacterium tumefaciens Stamm C58C1:pGV2260 transformiert und unter Streptomycin/Spectinomycin-Selektion inkubiert. Zur Transformation von Tabakpflanzen der Sorte Nicotiana tabacum cv. Samsun NN mit dem Konstrukt
- 25 pBinNtSPP-RNAi wurde eine in YEB-Medium (5g/l beef extract, 1g/l yeast extract, 5g/l peptone, 5g/l sucrose, pH 7,2) auf OD₆₀₀ = 0.8-1.6 verdünnte Übernachtskultur einer positiv transformierten Agrobakterienkolonie benutzt. Nach 5-10 Minuten Inkubation steriler Blattscheiben der Pflanzen (zu je ca. 1 cm²) in einer Petri-
- 30 schale mit der auf OD₆₀₀ = 0.8-1.6 verdünnte Übernachtskultur der Agrobakterien folgte eine 2-tägige Inkubation in Dunkelheit bei 25°C auf Murashige-Skoog Medium (nach Murashige-Skoog, Physiol. Plant. 15(1962), 473) mit 2% Saccharose (2MS-Medium) mit 0,8 % Bacto-Agar). Im Anschluß wurde die Kultivierung für/über einen
- 35 Zeitraum von mehreren Wochen mit 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit weitergeführt. Die Blattscheiben/Calli wurden wöchentlich auf frisches MS-Medium mit 500mg/l Claforan (Cefotaxime-Natrium), 50mg/l Kanamycin, 1mg/l Benzylaminopurin (BAP), 0,2mg/l Naphtyllessigsäure und 1,6g/l Glukose umgesetzt. Wachsende Sprossen wurden
- 40 auf MS-Medium mit 2% Saccharose, 250 mg/l Claforan und 0,8 % Bacto-Agar überführt und im Anschluß auf 2MS-Medium mit Kanamycin und Claforan selektiert. Die auf diese Weise erhaltenen transgenen Pflanzen wurden in Erde gesetzt und für 2-20 Wochen im Gewächshaus auf die Ausprägung von Phänotypen beobachtet. Dabei
- 45 stellte sich heraus, dass die transgenen Pflanzen deutliche Wachstumsretardierungen, chlorotische Blätter und vereinzelt Nekrosen aufwiesen. Durch halbquantitative PCR konnte gezeigt werden, dass in Pflanzen mit diesen Phänotypen in unterschiedlichem Mass die

Expression der SPP unterdrückt war, wodurch der Zusammenhang zwischen Pflanzenwachstum und SPP-Expression gezeigt wurde.

- 20µg Gesamt-RNA von ausgewählten Linien (Linien 10, 16, 18, 31) sowie von einer nicht-transgenen Kontrollen (WT) wurde zunächst mit DNase (Böhringer Mannheim) bei 37°C für 45 min verdaut und diese anschliessend für 10 min bei 65°C inhibiert. Nach Phenol/Choroform/Isoamylalkohol (25:24:1) Behandlung wurde die RNA mit Natriumacetat gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in 100µl DEPC-behandeltem H₂O gelöst. Die cDNA Erststrangsynthese wurde in einem Ansatz mit 12,5µl DNase behandelte RNA, 5µl 5x Reaktions-Puffer, 2µl dNTPs (2,5 mM), 1µl Oligo dT Primer (50 mM, dT[30]V[G/C/A]) und 2,5µl DEPC-behandeltem H₂O nach Inkubation für 5 min bei 65°C, dann für 5 min bei 37°C schliesslich nach Zugabe von 1µl Reverser Transkriptase (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase, Rnase H Minus, M-MLV [H-], Promega) und 1µl RNase-Inhibitor bei 37°C (60 min) durchgeführt. Nach Hitzeinaktivierung für 5 min bei 95°C wurde die cDNA als Matrize für die anschliessende PCR eingesetzt. NtSPP cDNA wurde mit dem 5' Primer CS36 (5'-GTT AGT GTT CTC AAC TGG GAG ATC ACC-3') und dem 3' Primer CS37 (5'-CCC ATT TCT TGA AAC TCA CTA ACC ATG A-3'), der interne Standard Actin wurde mit dem Primerpaar D₂O₂ (5'-ATG GCA GAC GGT GAG GAT ATT CA-3') und D203 (5'-GCC TTT GCA ATC CAC ATC TGT TG-3') amplifiziert (wie AC1 und AC2, Romeis et al. 2001, EMBO J 20: 5556). Die PCR-Ansätze (Gesamtvolumen 100µl) setzten sich wie folgt zusammen: 70µl H₂O, 5µl CS36 5'Primer (5µM), 5µl 3' Primer CS37 (5µM), 8µl dNTPs (2,5 mM), 10µl 10x Reaktions-Puffer, 1µl cDNA und 5 U rTaq DNA Polymerase (Takara Shouzo, Japan). Vor Beginn der Amplifikationszyklen wurden die Ansätze für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Polymerisierungsschritte wurden in einem automatischen T3-Thermocycler (Biometra) nach folgendem Programm durchgeführt: Denaturierung 95°C (1 min), Anlagerung der Primer bei 55°C (45 Sekunden), Polymerase-Reaktion bei 72°C (2 min). Nach 25, 30, und 45 Zyklen wurden jeweils 10µl des PCR-Ansatzes auf ein Gel aufgetragen. Das Ergebnis zeigt im nicht-gesättigten PCR-Bereich (35 Zyklen) bei Verwendung der NtSPP-spezifischen Primer nur die Amplifizierung von Produkten in den Wildtyp-Kontrollen und nicht in 3 der 4 transgenen Linien, was auf sehr effizientes "Silencing" schliessen lässt. Die PCR mit den Actin spezifischen Primern hingegen zeigt im ungesättigten Bereich bei 35 Zyklen gleichmässige DNA-Banden, was den Einssatz vergleichbarer Mengen an eingesetzter Matrize belegt.

45

Zur Expression der SPP2 aus *N. tabaccum* in *E. coli* wurde SEQ ID NO:1 über PCR unter Verwendung der Primer

FB228 5'-GGA TCC ATG GAT CAG CTA ACC AGT GCC -3'

5

SPPr 5'-GTC GAC CTA AAA GAA CCA GGA CGC GGA GTC ACT-3'

und der cDNA-Bank aus *Nicotiana tabacum* als Template amplifiziert, wobei die Primer eine BamHI bzw. SalI Erkennungsstelle in die Sequenz einführen. Das so erhaltene Fragment wurde nach der Ligation in den Vektor pCR-Blunt über BamHI und SalI ausgeschnitten und in den ebenfalls mit BamHI und SalI gespaltenen pQE-9 Vektor ligiert (Konstrukt pQE-NtSPP2).

Beispiel 5 - Expression der NtSPP2 in *E. coli*

Die Expression des rekombinanten Proteins erfolgte nach Herstellerangaben (Qiagen, Hilden, Deutschland) in einem Kulturmaßstab von 50 ml. Nach Ernte der Zellen durch Zentrifugation wurde das Präzipitat in 1 ml 30 mM HEPES KOH (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure) (pH 7,5) resuspendiert und die lösliche Proteinfraction durch Ultraschallbehandlung freigesetzt und der nach Zentrifugation erhaltene Überstand zur Bestimmung der Enzymaktivität eingesetzt.

25

Beispiel 6 - Bestimmung der Aktivität von SSP

Der Nachweis von SPP Aktivität in Proteinextrakten erfolgt über die Erfassung des vom Enzym aus Saccharose-6-phosphat freigesetzten anorganischen Phosphates nach Lunn et al. (2000, Procl. Natl. Acad. Sci. USA 97: 12914). Dazu werden Enzymextrakte in einem Reaktionsansatz enthaltend 1,25 mM Saccharose-6-phosphat und 8 mM MgCl₂ in 25 mM HEPES-KOH, pH 7.0, in einem Gesamtvolumen von 300 µl bei 30 °C inkubiert. Durch Zugabe von 30 µl 2M Trichloressigsäure wird die Reaktion abgestoppt. Das während der Reaktion aus S-6-P freigesetzte Orthophosphat wird unter Verwendung des Ascorbat-Ammoniummolybdat-Reagenzes (nach Ames 1966, Methods Enzymol. 8, 115) quantifiziert. Der Nachweis wurde in miniaturisierter Form, wie z.B. in 96well und 384well Mikrotiterplatten durchgeführt.

Saccharose-6-Phosphat Phosphatase als Target für Herbizide

Zusammenfassung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung eines Polypeptides mit der biologischen Aktivität einer Saccharose-6-Phosphat Phosphatase, welches bei Nichtanwesenheit Wachstumsretardierungen sowie chlorotische Blätter bedingt und durch die Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 oder ein funktionelles Äquivalent SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 oder SEQ ID NO:5 kodiert wird, als Target für Herbizide. Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung des vorstehend genannten Polypeptides in einem Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider oder wachstumsregulatorischer Wirkung, welche Saccharose-6-Phosphat Phosphatase inhibieren. Des weiteren betrifft die Erfindung die Verwendung dieser über das Verfahren identifizierten Verbindungen als Herbizide oder Wachstumsregulatoren.

20

25

30

35

40

45

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> Saccharose-6-Phosphat Phosphatase als Target für
Herbizide

<130> 20020415

<140>

<141>

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1278

<212> DNA

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1275)

<400> 1

atg gat cag cta acc agt gcc gca cgt ctc atg ata gtc tca gat cta	48
Met Asp Gln Leu Thr Ser Ala Ala Arg Leu Met Ile Val Ser Asp Leu	
1 5 10 15	
gac cat aca atg gta gat cat cat gat gcc gag aac ctt tct ctg ctt	96
Asp His Thr Met Val Asp His His Asp Ala Glu Asn Leu Ser Leu Leu	
20 25 30	
aga ttt aat gct tta tgg gag gcg aat tat cgt gat aac tct ttg tta	144
Phe Asn Ala Leu Trp Glu Ala Asn Tyr Arg Asp Asn Ser Leu Leu	
35 40 45	
gtg ttc tca act ggg aga tca cct aca ctt tac aag gag ttg agg aaa	192
Val Phe Ser Thr Gly Arg Ser Pro Thr Leu Tyr Lys Glu Leu Arg Lys	
50 55 60	
gaa aag ccc atg cta acc cca gat att act att atg tcg gtg gga act	240
Glu Lys Pro Met Leu Thr Pro Asp Ile Thr Ile Met Ser Val Gly Thr	
65 70 75 80	
gaa ata aca tat ggt aac tct gtg gtg cct gat gat ggt tgg gaa gct	288
Glu Ile Thr Tyr Gly Asn Ser Val Val Pro Asp Asp Gly Trp Glu Ala	
85 90 95	
ttt cta aat aac aag tgg gac aga aag ata gta aca gag gag act agc	336
Phe Leu Asn Asn Lys Trp Asp Arg Lys Ile Val Thr Glu Glu Thr Ser	
100 105 110	
aag ttt cct gaa ctc act cta cag tca gaa acg gag cag cga cca cac	384
Lys Phe Pro Glu Leu Thr Leu Gln Ser Glu Thr Glu Gln Arg Pro His	
115 120 125	

2

aag gtc agt ttc tat gtt cag aaa gac aaa gca caa gat ata atg aaa	432
Lys Val Ser Phe Tyr Val Gln Lys Asp Lys Ala Gln Asp Ile Met Lys	
130 135 140	
act ctt tcc aag cgc ttc gaa gaa cgt ggg ctg gat gtc aaa ata att	480
Thr Leu Ser Lys Arg Phe Glu Glu Arg Gly Leu Asp Val Lys Ile Ile	
145 150 155 160	
tac agt gga ggc atg gat cta gat ata tta cca caa ggt gct ggc aaa	528
Tyr Ser Gly Gly Met Asp Leu Asp Ile Leu Pro Gln Gly Ala Gly Lys	
165 170 175	
gga caa gca ctt gca tat ttg ctt aag aaa ttg aag agt gag gga aaa	576
Gly Gln Ala Leu Ala Tyr Leu Leu Lys Lys Leu Lys Ser Glu Gly Lys	
180 185 190	
cta cca aac aac acc ctt gcc tgt ggt gac tct ggg aat gat gct gag	624
Leu Pro Asn Asn Thr Leu Ala Cys Gly Asp Ser Gly Asn Asp Ala Glu	
195 200 205	
cta ttc agt atc cca gat gtg tat ggt gta atg gta gct aat gca cag	672
Leu Phe Ser Ile Pro Asp Val Tyr Gly Val Met Val Ala Asn Ala Gln	
210 215 220	
gag gaa tta ttg caa tgg cat gct gca aat gcg aag aat aat cct aaa	720
Glu Glu Leu Leu Gln Trp His Ala Ala Asn Ala Lys Asn Asn Pro Lys	
225 230 235 240	
gta att cat gca aca gag agg tgt gct gcc ggt atc ata caa gct att	768
Val Ile His Ala Thr Glu Arg Cys Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ala Ile	
245 250 255	
ggg cat tcc aac cta ggt cca agt acc tcc cct aga gat gtt atg gat	816
Gly His Ser Asn Leu Gly Pro Ser Thr Ser Pro Arg Asp Val Met Asp	
260 265 270	
ttg tca gac tgc aag atg gag aac ttt gtt ccc gcc tat gaa gtt gtc	864
Leu Ser Asp Cys Lys Met Glu Asn Phe Val Pro Ala Tyr Glu Val Val	
275 280 285	
aaa ttt tac cta ttt ttt gag aaa tgg agg cgt gga gaa att gag cat	912
Lys Phe Tyr Leu Phe Phe Glu Lys Trp Arg Arg Gly Glu Ile Glu His	
290 295 300	
tct gag cat tac ctg tca aac ctt aaa gca gtg tgt aga cca tct ggt	960
Ser Glu His Tyr Leu Ser Asn Leu Lys Ala Val Cys Arg Pro Ser Gly	
305 310 315 320	
act ttt gtc cac cca tct ggt gtt gag aaa tcc ctc cag gaa tgt gta	1008
Thr Phe Val His Pro Ser Gly Val Glu Lys Ser Leu Gln Glu Cys Val	
325 330 335	
act tta ttc ggg aca tgt cat ggt gac aaa cag ggg aaa caa ttt cgt	1056
Thr Leu Phe Gly Thr Cys His Gly Asp Lys Gln Gly Lys Gln Phe Arg	
340 345 350	

3

att tgg gtc gat caa gtt tta cct gta cag gtt ggt tcg gac tca tgg 1104
 Ile Trp Val Asp Gln Val Leu Pro Val Gln Val Gly Ser Asp Ser Trp
 355 360 365

tta gtg agt ttc aag aaa tgg gag ctc tct ggt gaa gac agg cga tgt 1152
 Leu Val Ser Phe Lys Lys Trp Glu Leu Ser Gly Glu Asp Arg Arg Cys
 370 375 380

tgc ata act aca gtc cta tta agt tca aag aat aag act gtc gca gat 1200
 Cys Ile Thr Thr Val Leu Leu Ser Ser Lys Asn Lys Thr Val Ala Asp
 385 390 395 400

gga ctc act tgg acc cac gta cat cag aca tgg ctg aat gga gct gca 1248
 Gly Leu Thr Trp Thr His Val His Gln Thr Trp Leu Asn Gly Ala Ala
 405 410 415

a agt gac tcc gcg tcc tgg ttc ttt tag 1278
 a Ser Asp Ser Ala Ser Trp Phe Phe
 420 425

<210> 2

<211> 425

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<400> 2

Met Asp Gln Leu Thr Ser Ala Ala Arg Leu Met Ile Val Ser Asp Leu
 1 5 10 15

Asp His Thr Met Val Asp His His Asp Ala Glu Asn Leu Ser Leu Leu
 20 25 30

Arg Phe Asn Ala Leu Trp Glu Ala Asn Tyr Arg Asp Asn Ser Leu Leu
 35 40 45

Phe Ser Thr Gly Arg Ser Pro Thr Leu Tyr Lys Glu Leu Arg Lys
 50 55 60

Glu Lys Pro Met Leu Thr Pro Asp Ile Thr Ile Met Ser Val Gly Thr
 65 70 75 80

Glu Ile Thr Tyr Gly Asn Ser Val Val Pro Asp Asp Gly Trp Glu Ala
 85 90 95

Phe Leu Asn Asn Lys Trp Asp Arg Lys Ile Val Thr Glu Glu Thr Ser
 100 105 110

Lys Phe Pro Glu Leu Thr Leu Gln Ser Glu Thr Glu Gln Arg Pro His
 115 120 125

Lys Val Ser Phe Tyr Val Gln Lys Asp Lys Ala Gln Asp Ile Met Lys
 130 135 140

Thr Leu Ser Lys Arg Phe Glu Glu Arg Gly Leu Asp Val Lys Ile Ile
 145 150 155 160

4

Tyr Ser Gly Gly Met Asp Leu Asp Ile Leu Pro Gln Gly Ala Gly Lys
 165 170 175
 Gly Gln Ala Leu Ala Tyr Leu Leu Lys Lys Leu Lys Ser Glu Gly Lys
 180 185 190
 Leu Pro Asn Asn Thr Leu Ala Cys Gly Asp Ser Gly Asn Asp Ala Glu
 195 200 205
 Leu Phe Ser Ile Pro Asp Val Tyr Gly Val Met Val Ala Asn Ala Gln
 210 215 220
 Glu Glu Leu Leu Gln Trp His Ala Ala Asn Ala Lys Asn Asn Pro Lys
 225 230 235 240
 Val Ile His Ala Thr Glu Arg Cys Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ala Ile
 245 250 255
 Gly His Ser Asn Leu Gly Pro Ser Thr Ser Pro Arg Asp Val Met Asp
 260 265 270
 Leu Ser Asp Cys Lys Met Glu Asn Phe Val Pro Ala Tyr Glu Val Val
 275 280 285
 Lys Phe Tyr Leu Phe Phe Glu Lys Trp Arg Arg Gly Glu Ile Glu His
 290 295 300
 Ser Glu His Tyr Leu Ser Asn Leu Lys Ala Val Cys Arg Pro Ser Gly
 305 310 315 320
 Thr Phe Val His Pro Ser Gly Val Glu Lys Ser Leu Gln Glu Cys Val
 325 330 335
 Thr Leu Phe Gly Thr Cys His Gly Asp Lys Gln Gly Lys Gln Phe Arg
 340 345 350
 Ile Trp Val Asp Gln Val Leu Pro Val Gln Val Gly Ser Asp Ser Trp
 355 360 365
 Leu Val Ser Phe Lys Lys Trp Glu Leu Ser Gly Glu Asp Arg Arg Cys
 370 375 380
 Cys Ile Thr Thr Val Leu Leu Ser Ser Lys Asn Lys Thr Val Ala Asp
 385 390 395 400
 Gly Leu Thr Trp Thr His Val His Gln Thr Trp Leu Asn Gly Ala Ala
 405 410 415
 Ala Ser Asp Ser Ala Ser Trp Phe Phe
 420 425

<210> 3

<211> 1278

<212> DNA

<213> Nicotiana tabacum

5

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1275)

<400> 3

atg gat cag cta acc agt gcc gca cgt ctc atg ata gtc tca gat ctt	48
Met Asp Gln Leu Thr Ser Ala Ala Arg Leu Met Ile Val Ser Asp Leu	
1 5 10 15	

gac cat acc atg gtt gat cat cat gat cct gag aac ctt tct ctg ctt	96
Asp His Thr Met Val Asp His His Asp Pro Glu Asn Leu Ser Leu Leu	
20 25 30	

agg ttt aat gct tta tgg gag gcc aat tat cgt gaa aac tcc ttg tta	144
Arg Phe Asn Ala Leu Trp Glu Ala Asn Tyr Arg Glu Asn Ser Leu Leu	
35 40 45	

g ttc tca act ggg aga tca cct acc ctt tac aag gag ttg aga aaa	192
Val Phe Ser Thr Gly Arg Ser Pro Thr Leu Tyr Lys Glu Leu Arg Lys	
50 55 60	

gag aag ccc atg cta acc cca gat att acc att atg tct gtg ggg act	240
Glu Lys Pro Met Leu Thr Pro Asp Ile Thr Ile Met Ser Val Gly Thr	
65 70 75 80	

gaa ata act tat ggt aac tct atg gag cca gat gat ggt tgg gaa gca	288
Glu Ile Thr Tyr Gly Asn Ser Met Glu Pro Asp Asp Gly Trp Glu Ala	
85 90 95	

ttt tta aat gat aag tgg gat cgg aaa ata gtg aca gag gag aca agc	336
Phe Leu Asn Asp Lys Trp Asp Arg Lys Ile Val Thr Glu Glu Thr Ser	
100 105 110	

aaa ttt cct gaa ctc acc ctt cag tca gaa aca gag cag cga cca cac	384
Asn Phe Pro Glu Leu Thr Leu Gln Ser Glu Thr Glu Gln Arg Pro His	
115 120 125	

aag gtc agt ttc tat gtt cag aaa gac aag gct caa gat ata acg gga	432
Lys Val Ser Phe Tyr Val Gln Lys Asp Lys Ala Gln Asp Ile Thr Gly	
130 135 140	

act ctt tcc aag cgc ttg gaa gaa cgt ggg ttg gat gtc aaa ata att	480
Thr Leu Ser Lys Arg Leu Glu Glu Arg Gly Leu Asp Val Lys Ile Ile	
145 150 155 160	

tat agc gga ggg atg gat ttg gac att ttg cca caa ggt gct ggc aaa	528
Tyr Ser Gly Gly Met Asp Leu Asp Ile Leu Pro Gln Gly Ala Gly Lys	
165 170 175	

gga cga gca ctt gca tat ttg ctt aag aaa tta aag agt gag ggc aag	576
Gly Arg Ala Leu Ala Tyr Leu Leu Lys Lys Leu Lys Ser Glu Gly Lys	
180 185 190	

tta cca aac aac acg ctt gcc tgt ggt gac tct gga aat gat gct gag	624
Leu Pro Asn Asn Thr Leu Ala Cys Gly Asp Ser Gly Asn Asp Ala Glu	
195 200 205	

6

ctt ttc agt atc cca gat gtt tat ggt gtg atg gta gcg aat gca cag	672
Leu Phe Ser Ile Pro Asp Val Tyr Gly Val Met Val Ala Asn Ala Gln	
210 215 220	
gag gag tta tta caa tgg cgt gct gca aat gca aaa gat agt cca aaa	720
Glu Glu Leu Leu Gln Trp Arg Ala Ala Asn Ala Lys Asp Ser Pro Lys	
225 230 235 240	
gta att cat gca aca gag aga tgt gcc gcg ggt ata ata caa gca att	768
Val Ile His Ala Thr Glu Arg Cys Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ala Ile	
245 250 255	
ggg cat ttc aac ctg gga cca aat acc tct cct aga gat gtt aca gat	816
Gly His Phe Asn Leu Gly Pro Asn Thr Ser Pro Arg Asp Val Thr Asp	
260 265 270	
atg tca gac tgc aag atg gag aat ttt gtt cct gct tat gaa gtc gtc	864
Met Ser Asp Cys Lys Met Glu Asn Phe Val Pro Ala Tyr Glu Val Val	
275 280 285	
aaa ttt tac ttg ttt ttc gag aaa tgg agg cgt gga gaa att gag aat	912
Lys Phe Tyr Leu Phe Phe Glu Lys Trp Arg Arg Gly Glu Ile Glu Asn	
290 295 300	
tct gac ctt cac ttg tca aac ctg aaa gca gtt tgt aga cca tcc ggt	960
Ser Asp Leu His Leu Ser Asn Leu Lys Ala Val Cys Arg Pro Ser Gly	
305 310 315 320	
act ttt gtg cac cca tct gga gtt gag aaa tat ctt gag gac tgc ata	1008
Thr Phe Val His Pro Ser Gly Val Glu Lys Tyr Leu Glu Asp Cys Ile	
325 330 335	
aat aca ttg aga act tgt cac ggt gac aaa cag ggt aaa caa ttt cgt	1056
Asn Thr Leu Arg Thr Cys His Gly Asp Lys Gln Gly Lys Gln Phe Arg	
340 345 350	
att tgg gtt gat cta gtg tta cct aca cag gtt ggt tca gat tca tgg	1104
Ile Trp Val Asp Leu Val Leu Pro Thr Gln Val Gly Ser Asp Ser Trp	
355 360 365	
tta gtg agt ttc aag aaa tgg gag ctt tgt ggc gaa gag cga caa tgt	1152
Leu Val Ser Phe Lys Lys Trp Glu Leu Cys Gly Glu Glu Arg Gln Cys	
370 375 380	
tgc ata act act gtc ttg tta agt tca aag aat gtg acg gtc gcg gat	1200
Cys Ile Thr Thr Val Leu Leu Ser Ser Lys Asn Val Thr Val Ala Asp	
385 390 395 400	
ggg ctc act tgg aca cat gtg cat cag act tgg ctg cag gga gca gca	1248
Gly Leu Thr Trp Thr His Val His Gln Thr Trp Leu Gln Gly Ala Ala	
405 410 415	
gca agt gac tcc gcg tcc tgg ttc ttt taa	1278
Ala Ser Asp Ser Ala Ser Trp Phe Phe	
420 425	

<210> 4

<211> 425

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<400> 4

Met Asp Gln Leu Thr Ser Ala Ala Arg Leu Met Ile Val Ser Asp Leu
1 5 10 15

Asp His Thr Met Val Asp His His Asp Pro Glu Asn Leu Ser Leu Leu
20 25 30

Arg Phe Asn Ala Leu Trp Glu Ala Asn Tyr Arg Glu Asn Ser Leu Leu
35 40 45

Val Phe Ser Thr Gly Arg Ser Pro Thr Leu Tyr Lys Glu Leu Arg Lys
50 55 60

Glu Lys Pro Met Leu Thr Pro Asp Ile Thr Ile Met Ser Val Gly Thr
65 70 75 80

Glu Ile Thr Tyr Gly Asn Ser Met Glu Pro Asp Asp Gly Trp Glu Ala
85 90 95

Phe Leu Asn Asp Lys Trp Asp Arg Lys Ile Val Thr Glu Glu Thr Ser
100 105 110

Lys Phe Pro Glu Leu Thr Leu Gln Ser Glu Thr Glu Gln Arg Pro His
115 120 125

Lys Val Ser Phe Tyr Val Gln Lys Asp Lys Ala Gln Asp Ile Thr Gly
130 135 140

Thr Leu Ser Lys Arg Leu Glu Glu Arg Gly Leu Asp Val Lys Ile Ile
150 155 160

Ser Gly Gly Met Asp Leu Asp Ile Leu Pro Gln Gly Ala Gly Lys
165 170 175

Gly Arg Ala Leu Ala Tyr Leu Leu Lys Lys Leu Lys Ser Glu Gly Lys
180 185 190

Leu Pro Asn Asn Thr Leu Ala Cys Gly Asp Ser Gly Asn Asp Ala Glu
195 200 205

Leu Phe Ser Ile Pro Asp Val Tyr Gly Val Met Val Ala Asn Ala Gln
210 215 220

Glu Glu Leu Leu Gln Trp Arg Ala Ala Asn Ala Lys Asp Ser Pro Lys
225 230 235 240

Val Ile His Ala Thr Glu Arg Cys Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ala Ile
245 250 255

Gly His Phe Asn Leu Gly Pro Asn Thr Ser Pro Arg Asp Val Thr Asp
260 265 270

60

agg aaa gaa aag ccc atg cta acc cca gat att aca att atg tct gtg	303
Arg Lys Glu Lys Pro Met Leu Thr Pro Asp Ile Thr Ile Met Ser Val	
65 70 75	
gga act gaa ata aca tat ggt aac gct atg gtg cct gat gat ggt tgg	351
Gly Thr Glu Ile Thr Tyr Gly Asn Ala Met Val Pro Asp Asp Gly Trp	
80 85 90	
gaa aca ttt ctg aat aac aag tgg gat aga aag ata gta aca gag gag	399
Glu Thr Phe Leu Asn Asn Lys Trp Asp Arg Lys Ile Val Thr Glu Glu	
95 100 105 110	
aca agc aag ttt cct gaa ctg agt ctg cag tca gaa aca gag cag cga	447
Thr Ser Lys Phe Pro Glu Leu Ser Leu Gln Ser Glu Thr Glu Gln Arg	
115 120 125	
cac aag gtc agt ttc tat gtt cag aaa gag aaa gct caa gat ata	495
His Lys Val Ser Phe Tyr Val Gln Lys Glu Lys Ala Gln Asp Ile	
130 135 140	
atg aaa act ctt tcc aag cgc ttg gaa gaa cgt ggg ctg gat gtc aaa	543
Met Lys Thr Leu Ser Lys Arg Leu Glu Glu Arg Gly Leu Asp Val Lys	
145 150 155	
ata att tac agt gga ggg atg gat cta gat ata tta cca cag ggt gct	591
Ile Ile Tyr Ser Gly Gly Met Asp Leu Asp Ile Leu Pro Gln Gly Ala	
160 165 170	
ggc aaa gga caa gca ctt gca tat ctg ctt aag aaa ctg aag agc gag	639
Gly Lys Gly Gln Ala Leu Ala Tyr Leu Leu Lys Lys Leu Lys Ser Glu	
175 180 185 190	
gga aaa tta cca agc aac acc ctt gcc tgc ggc gac tcc ggg aat gac	687
Gly Lys Leu Pro Ser Asn Thr Leu Ala Cys Gly Asp Ser Gly Asn Asp	
195 200 205	
gct gaa tta ttc agt atc cca gat gtg tat ggt gta atg gta gct aat	735
Ala Glu Leu Phe Ser Ile Pro Asp Val Tyr Gly Val Met Val Ala Asn	
210 215 220	
gcg cag aag gaa tta ctg cag tgg cat gct gca aat gca aaa aat aat	783
Ala Gln Lys Glu Leu Leu Gln Trp His Ala Ala Asn Ala Lys Asn Asn	
225 230 235	
ccc aaa gta att cat gca tca gag agg tgt gcc gcc ggt atc ata caa	831
Pro Lys Val Ile His Ala Ser Glu Arg Cys Ala Ala Gly Ile Ile Gln	
240 245 250	
gcc att ggt cat ttc aaa cta ggt cca agt acc tcc cca aga gac gtt	879
Ala Ile Gly His Phe Lys Leu Gly Pro Ser Thr Ser Pro Arg Asp Val	
255 260 265 270	
acg gat ttg tca gat tgc aag atg gac aac ttt gtt cct gcc tat gaa	927
Thr Asp Leu Ser Asp Cys Lys Met Asp Asn Phe Val Pro Ala Tyr Glu	
275 280 285	

10

gtt gtc aaa ttt tac ctg ttt ttt gag aaa tgg agg cgt gga gaa att 975
Val Val Lys Phe Tyr Leu Phe Phe Glu Lys Trp Arg Arg Gly Glu Ile
290 295 300

gag cat tct gag cat tat ctg cca aac ctg aaa gca gtg tgt ata cca 1023
Glu His Ser Glu His Tyr Leu Pro Asn Leu Lys Ala Val Cys Ile Pro
305 310 315

tct ggt act ttt gtt cac cca tct ggt gtt gag aaa tcc ctt cag gaa 1071
Ser Gly Thr Phe Val His Pro Ser Gly Val Glu Lys Ser Leu Gln Glu
320 325 330

tgt gta act tca ttc gga aca tgt cat gct gac aag cag ggg aaa caa 1119
Cys Val Thr Ser Phe Gly Thr Cys His Ala Asp Lys Gln Gly Lys Gln
335 340 345 350

cat cgt gtt tgg gtc gat caa gtt tta cct tca cag gtt ggt tca gac 1167
Tyr Arg Val Trp Val Asp Gln Val Leu Pro Ser Gln Val Gly Ser Asp
355 360 365

tca tgg tta gtg agt ttc aag aag tgg gag ctc tct ggt gaa gac atg 1215
Ser Trp Leu Val Ser Phe Lys Lys Trp Glu Leu Ser Gly Glu Asp Met
370 375 380

cga tgc tgc ata acc aca gtc cta tta agt tca aag aat aag act gtt 1263
Arg Cys Cys Ile Thr Thr Val Leu Leu Ser Ser Lys Asn Lys Thr Val
385 390 395

gca gac ggg ctc act tgg act cac gta cat cag aca tgg ctg cac ggt 1311
Ala Asp Gly Leu Thr Trp Thr His Val His Gln Thr Trp Leu His Gly
400 405 410

gat gca gca agt gac tcc gca acc tgg ttc ttt tagattgtca tctcagtgt 1364
sp Ala Ala Ser Asp Ser Ala Thr Trp Phe Phe
415 420 425

ttaactctga aaattccgca cccctttttac cagttcacac ccagaataaa cacaacatac 1424

aaactatagt tgataatcaa tgtattaact ttctccttct ttgataatca atgtattgcc 1484

atctaaacca gtgaagatgg ctttatcttt tgtgtagtat aaagaattat attagtatca 1544

tagttgttct tgtatttgat tcagaattca agatgagatt gttgcaaatt gctgcatatt 1604

taagtttcca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1642

<210> 6

<211> 425

<212> PRT

<213> Solanum tuberosum

<400> 6

Met Asp Arg Leu Thr Ser Ala Ala Arg Leu Met Ile Val Ser Asp Leu

11

Asp His Thr Met Val Asp His His Asp Ser Glu Asn Leu Ser Leu Leu
20 25 30

Arg Phe Asn Ala Leu Trp Glu Ala Asn Tyr Arg Asp Asn Ser Leu Leu
35 40 45

Val Phe Ser Thr Gly Arg Ser Pro Thr Leu Tyr Lys Glu Leu Arg Lys
50 55 60

Glu Lys Pro Met Leu Thr Pro Asp Ile Thr Ile Met Ser Val Gly Thr
65 70 75 80

Glu Ile Thr Tyr Gly Asn Ala Met Val Pro Asp Asp Gly Trp Glu Thr
85 90 95

Phe Leu Asn Asn Lys Trp Asp Arg Lys Ile Val Thr Glu Glu Thr Ser
100 105 110

Lys Phe Pro Glu Leu Ser Leu Gln Ser Glu Thr Glu Gln Arg Pro His
115 120 125

Lys Val Ser Phe Tyr Val Gln Lys Glu Lys Ala Gln Asp Ile Met Lys
130 135 140

Thr Leu Ser Lys Arg Leu Glu Glu Arg Gly Leu Asp Val Lys Ile Ile
145 150 155 160

Tyr Ser Gly Gly Met Asp Leu Asp Ile Leu Pro Gln Gly Ala Gly Lys
165 170 175

Gly Gln Ala Leu Ala Tyr Leu Leu Lys Lys Leu Lys Ser Glu Gly Lys
180 185 190

Leu Pro Ser Asn Thr Leu Ala Cys Gly Asp Ser Gly Asn Asp Ala Glu
195 200 205

Phe Ser Ile Pro Asp Val Tyr Gly Val Met Val Ala Asn Ala Gln
210 215 220

Lys Glu Leu Leu Gln Trp His Ala Ala Asn Ala Lys Asn Asn Pro Lys
225 230 235 240

Val Ile His Ala Ser Glu Arg Cys Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ala Ile
245 250 255

Gly His Phe Lys Leu Gly Pro Ser Thr Ser Pro Arg Asp Val Thr Asp
260 265 270

Leu Ser Asp Cys Lys Met Asp Asn Phe Val Pro Ala Tyr Glu Val Val
275 280 285

Lys Phe Tyr Leu Phe Phe Glu Lys Trp Arg Arg Gly Glu Ile Glu His
290 295 300

Ser Glu His Tyr Leu Pro Asn Leu Lys Ala Val Cys Ile Pro Ser Gly
305 310 315 320

12

Thr Phe Val His Pro Ser Gly Val Glu Lys Ser Leu Gln Glu Cys Val
325 330 335

Thr Ser Phe Gly Thr Cys His Ala Asp Lys Gln Gly Lys Gln Tyr Arg
340 345 350

Val Trp Val Asp Gln Val Leu Pro Ser Gln Val Gly Ser Asp Ser Trp
355 360 365

Leu Val Ser Phe Lys Lys Trp Glu Leu Ser Gly Glu Asp Met Arg Cys
370 375 380

Cys Ile Thr Thr Val Leu Leu Ser Ser Lys Asn Lys Thr Val Ala Asp
385 390 395 400

Gly Leu Thr Trp Thr His Val His Gln Thr Trp Leu His Gly Asp Ala
405 410 415

Ala Ser Asp Ser Ala Thr Trp Phe Phe
420 425

<210> 7

<211> 199

<212> DNA

<213> Solanum tuberosum

<400> 7

gtacggaccg tactactcta ttcgtttcaa tatatttatt tgtttcagct gactgcaaga 60
ttcaaaaatt tctttattat tttaaatttt gtgtcactca aaaccagata aacaatttga 120
tatagagcca ctatatatat acatattctc gattatatat gtaaagaggt tacccttttt 180
ttccacttaa attatatag 199